

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XLI, HEFT 1
MIT 55 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 5. JANUAR 1962



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1952

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 640 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertsraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, Russ. Zone

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Kosten für etwa nötige Umzeichnungen werden dem Verfasser in Rechnung gestellt. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist ein Unkostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

Die Aufnahme von Artikeln, welche bereits an anderer Stelle in wörtlich oder auch nur inhaltlich gleicher Fassung publiziert worden sind, wird abgelehnt. „Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Jänner desjenigen Jahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Der Verfasser verpflichtet sich also, innerhalb dieser Frist seinen im Protoplasma abgedruckten Beitrag nicht anderweitig zu veröffentlichen.

Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Beiträge kostenlos und können weitere (bis zu 200) gegen angemessene Berechnung beziehen. Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Springer-Verlag, Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien

XLI. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Abhandlungen

| | Seite |
|--|-------|
| Härtel, Otto: Färbungsstudien an der pflanzlichen Kutikula..... | 1 |
| Ziegenspeck, Hermann und Hugo Ziegenspeck: Über den Aufbau der Wandungen von <i>Cladophora glomerata</i> im Lichte der verfeinerten Methoden der Lichtmikroskopie | 15 |
| Schwöbel, Wilhelm: Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von <i>Parascaris equorum</i> (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms..... | 21 |
| Cholnoky, B. J.: Beobachtungen über die Wirkung der Kalilauge auf das Protoplasma | 57 |
| Kenda, Griseldis, Irmtraud Thaler und Friedl Weber: Sphärit-Bildung aus <i>Cirsium</i> -Zellsaft | 69 |
| Höfler, Karl und Luise Höfler: Osmoseverhalten und Nekroseformen von <i>Euglena</i> | 76 |
| Toth, Annemarie: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht..... | 103 |
| Weber, Friedl und Griseldis Kenda: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln..... | 111 |

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Färbungsstudien an der pflanzlichen Kutikula

Von

Otto Härtel

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

(Eingelangt am 29. Januar 1951)

In einer Reihe von Veröffentlichungen (Härtel 1947, 1950, 1951) konnte der Nachweis erbracht werden, daß sich die pflanzliche Kutikula im wesentlichen wie ein Ampholytoid verhält. Die isoelektrische Zone liegt zwischen p_H 5—7, in diesem Bereich ist ihre Durchlässigkeit maximal; sowohl nach der sauren wie auch nach der alkalischen Seite des IEP nimmt mit steigender Eigenladung die Durchlässigkeit ab. Quellbarkeit wie Durchlässigkeit werden durch An- und Kationen im Sinne der Hofmeisterschen Ionenreihe beeinflusst. Als Kriterium für diese Feststellungen diente in erster Linie die Wasserdurchlässigkeit der Kutikula, d. h. die Kutikulartranspiration. Zur weiteren Sicherung wäre aber der Nachweis von hohem Interesse, ob sich derartige Änderungen auch auf anderem Wege unter Benutzung anderer Kriterien bestätigen lassen. Wenn sich unter der Einwirkung von Ionen die Ladungsverhältnisse der Kutikula ändern, so müßte sich dies auch in ihrem Verhalten gegenüber sauren oder basischen Farbstoffen, soweit deren Festlegung in der Kutikula elektrostatisch bedingt ist, widerspiegeln; ist die Porenweite maßgebend, so ist zu erwarten, daß der Farbstoffzutritt in entsprechender Weise variiert wird bzw. eine Färbung nur durch bestimmte Farbstoffe von entsprechender Teilchengröße gelingt.

Nun stellt allerdings die Kutikula der Pflanzen gerade für die färbungsanalytische Bearbeitung ein recht sprödes Objekt dar. Zum Nachweis und zur Darstellung der Kutikula sind in der botanischen Mikrotechnik schon seit langem fettlösliche Farbstoffe, wie Sudan III (Buscalioni 1898) und Scharlach R (Lagerheim 1902) in Gebrauch, ferner sind Färbungen mit Alkannatinktur (Guignard 1890), Fettblau, Buttergelb und anderen Farbstoffen angegeben worden (Zusammenstellungen bei Zimmermann 1892, Richter 1905, Linsbauer 1930, Strasburger u. a.). Diese Färbungen beruhen auf der besseren Löslichkeit des Farbstoffes im Kutin als im alkoholischen Lösungsmittel, sie stellen demnach einen der Ausschüttelung analogen Vorgang dar und sind somit rein physikalisch bedingt (vgl. Zeiger 1938). Der Eintritt und die Wanderung dieser Farbstoffe erfolgt in der hydrophoben, fettartigen Phase der Kutikula, jedenfalls auf einem anderen Wege als der Wasserdurchtritt. Es ist daher nicht zu erwarten, daß das Studium derartiger Färbungen Wesentliches zu dem in Rede stehenden Problem beitragen wird. (Zudem verbietet sich die Anwendung alkoholischer und ähnlicher Lö-

sungen bei lebendem Material von selbst.) Dazu müssen wir Färbungen mit wasserlöslichen Farbstoffen, die wenigstens zum Teil auch auf elektrostatischem Wege festgelegt werden können, ins Auge fassen. Mit solchen ist aber die Kutikula bedeutend schlechter anfärbbar. Der Anteil der hydrophilen Phase ist, wie schon aus der niedrigen Wasserdurchlässigkeit hervorgeht, viel zu gering, um solchen Farbstoffen entsprechende Wanderungs- und Speicherungsmöglichkeit zu bieten (Frenzel 1929). Immerhin sind auch mit wasserlöslichen Farbstoffen einige mikrotechnisch verwertbare Färbungen angegeben worden. So gilt Gentianviolett als guter Farbstoff für Kutin (Zimmermann); nach Kisser (1928) sind auch mit Fuchsin, Magdalarot, Methyl- und Solidgrün gute Färbungen kutinierter Schichten zu erzielen. Mit *réactif genevois* (einer ammoniakalischen Lösung von Chrysoidin und Kongorot) färbt sich die Kutikula nach Chodat goldgelb; die Spezifität dieser Färbung wird allerdings von Plaut (1910) bezweifelt. Die für die Anfärbung maßgebende Komponente ist jedenfalls das Chrysoidin (Chodat 1911), also ein basischer Farbstoff. Bei solchen Farbstoffen wird eine Färbung der Kutikula vielfach verstärkt oder überhaupt erst möglich, wenn sie in alkalischer Lösung geboten werden, wie dies im *réactif genevois* der Fall ist. Mit alkalischer Anilin- oder Methylinblaulösung z. B. bleibt dagegen jede Anfärbung der Kutikula aus.

Mit sauren Farbstoffen ist eine Kutikularfärbung nur in wenigen Fällen möglich. Nach Kisser (1928) sind Eosin und Erythrosin zur Darstellung der Kutikula wenig geeignet. Indophenole scheinen eine deutliche Affinität zur Kutikula zu besitzen, sind allerdings nur sehr wenig wasserlöslich, die Speicherung dürfte in der Fettphase vor sich gehen; die Farbreaktion mittels „nadi“-Mischung (Zweibaum 1923) darf in diesem Zusammenhang wohl außer Betracht bleiben, da es sich dabei, ähnlich wie bei der Karbolfuchsinfärbung (Fischer 1912) und der Färbung mit dem Schiffischen Aldehydreagens (Géneau de Lamarliere 1906) um gleichzeitig verlaufende chemische Vorgänge handelt. Persio, gleichfalls der Indophenolgruppe zugehörig, vermag aus essigsaurer Lösung die Kutikula gelb anzufärben (Beck v. Managetta 1904). Basische Farben vermögen also, wenn überhaupt, vor allem aus alkalischer, saure dagegen aus saurer Lösung die Kutikula anzufärben, also jeweils aus der Lösung, in der der Farbstoff in undissoziierter Form, als Farbsalz oder Farbbase, vorliegt. In diesem Zustand sind die Farbstoffe leichter lipoidlöslich, können daher in die Fettphase der Kutikula eindringen und dort auf dem Wege der Löslichkeitsspeicherung festgelegt werden. Saure Farbstoffe wie Eosin oder Erythrosin zeichnen sich vielfach auch in undissoziiertem Zustand durch eine geringe Lipoidlöslichkeit aus oder verlieren dann ihre Farbe (Drawert 1941); damit erschiene die schlechte Färbbarkeit der Kutikula durch diese beiden Farbstoffe (Kisser 1928) hinreichend geklärt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besteht in der Annahme freier Säuregruppen innerhalb der Kutikula, durch die sie selbst Säurecharakter annimmt (azidoide Membran nach Michaelis); diese Gruppen können nach Frey-Wyssling einesteils die Verbindung mit der hydrophilen Zellulose herstellen, anderseits eine negative Membranladung bewirken (Brauner 1930, Czaja 1934) und so unter Umständen für die Farb-

stoffspeicherung in Frage kommen. Da mit steigender Alkalisierung des Farbbades auch der Säurecharakter der azidoiden bzw. ampholytoiden Membran zunimmt, wäre damit gleichfalls die Möglichkeit einer verstärkten Farbstoffspeicherung mit steigendem p_H gegeben. Die geringe Speicherung saurer Farbstoffe könnte auf eine geringe Menge von Basengruppen, die im sauren Bereich (vom Umladungspunkt der Membran aus gesehen) abgespalten werden, also auf einen vorwiegend azidoiden Charakter der Kutikula, zurückgehen; ähnliches ist ja bei der Zellulose der Fall, bei der man nach Höfler (1946) nur von einem Entladungspunkt, nicht aber von einer Umladbarkeit sprechen kann. Die deutliche Abhängigkeit der Wasserdurchlässigkeit der Kutikula gerade bei höherem c_H (Härtel 1947) lassen jedoch letztgenannte Möglichkeit, wenigstens für den sauren Bereich, weniger wahrscheinlich erscheinen, es dürften wohl andere Eigenschaften des sauren Farbstoffes (geringe Lipoidlöslichkeit) eher den Ausschlag geben. In diesem Zusammenhang erscheint auch das Verhalten von Nilblau interessant. Dieser basische Farbstoff wird nach Lee und Priestley (1924) und Linsbauer (1930) in der Kutikula und auch im Holz mit blaugrüner Farbe, also in der Farbe des Kations, resp. des Farbsalzes festgelegt. Während aber nachträgliche Ammoniakbehandlung im Holz einen Farbumschlag nach Rotviolett herbeiführt, bleibt im Kutin die blaue Farbe, die Nilblau auch in ölsaurer Lösung zeigt, bestehen (Linsbauer). Dies Verhalten läßt gleichfalls auf eine (polare) Adsorption des Nilblau als Farbsalz (vielleicht auch als Kation) schließen, wahrscheinlich unter Mitbeteiligung elektrostatischer Kräfte. Eine daneben bestehende rein lipoide Speicherung der Farbbase zu rotem Farbton wird durch die kräftige blaue Farbe des Salzes verdeckt, wie dies Spek (1943) für die Nilblaufärbung von Fetten und Lipoiden zeigen konnte.

Kutinisierte Zellwände lassen sich mit einer großen Reihe von Farbstoffen anfärben, und zwar sowohl basischen (Czaja 1934) als auch sauren (Czaja 1930, Frenzel 1929). Allerdings liegen in den kutinisierten Schichten noch andere Stoffe vor, namentlich Pektine (Anderson 1928, vgl. auch Frey-Wyssling 1948), die die Speicherungsbedingungen wesentlich ändern und keinen direkten Rückschluß auf das eigentliche Kutin erlauben. So benötigte Frenzel zur Anfärbung mit substantiven (also sauren) Farbstoffen eine dreitägige Einwirkung der konzentrierten Farbstofflösungen, wobei die so erhaltenen Färbungen namentlich in destilliertem Wasser sehr unbeständig waren. Mit basischen Farbstoffen dagegen gelingt eine Anfärbung kutinierter Schichten wesentlich leichter und in viel kürzeren Zeiten. Hierbei konnte bereits Czaja (1934) eine deutliche Abhängigkeit der Anfärbung vom p_H der Farblösung beobachten. Die Färbung kutinierter Wände beginnt bei Methylviolett um p_H 1 und wird gegen alkalisch immer intensiver; ebenso setzt die Farbstoffspeicherung bei Neutralrot zwischen p_H 0,78 und 4,9 (weitere Zwischenstufen sind nicht angeführt) mit karminrotem Ton, ein, der gegen den alkalischen Bereich hin immer intensiver gelbrot wird. Diese Farbstoffaufnahme geht aber, wie eigene Beobachtungen wahrscheinlich machen konnten, nicht auf das Kutin selbst zurück. Färbt man z. B. Blattepidermen von *Clivia nobilis* mit basischen Farbstoffen, z. B. Neutralrot, so erscheint um p_H 2–3 nur die Basalschicht der verdickten Außenwand der

Epidermis gefärbt. Mit steigendem p_H wird die gefärbte Zone immer breiter und reicht immer weiter gegen die Kutikula hin, bis sie in alkalischem Farbad in ihrer ganzen Dicke, wenn auch mit von innen nach außen abnehmender Farbintensität, durchgefärbt erscheint. Dieses Verhalten (es läßt sich in ähnlicher Weise auch bei *Gasteria*- oder *Yucca*-Blättern, weniger gut bei *Dasyllirion* reproduzieren) deckt sich weitgehend mit dem Schema des Aufbaues kutinierter Schichten nach Anderson (1928) und Meyer (1938). Die stark färbbare Basalschichte entspricht der Pektinlamelle; nach außen nimmt der Pektingehalt und entsprechend die Färbbarkeit ab, während der Gehalt an Kutin zunimmt. Mit Rutheniumrot ergibt sich ein ganz analoges Bild. Ob die geschilderte p_H -Abhängigkeit ihre hauptsächliche Ursache in Änderungen der Dissoziationsverhältnisse des verwendeten Farbstoffes oder in Ladungsänderungen der verschiedenen Membrankomponenten hat, soll hier nicht weiter erörtert werden und einer späteren Studie vorbehalten bleiben. Im Zusammenhang mit der eingangs gestellten Frage interessiert in erster Linie, ob die Anfärbbarkeit der eigentlichen Kutikula einer ähnlichen p_H -Abhängigkeit folgt.

Die Zahl der für derartige Färbungsuntersuchungen an der Kutikula verwendbaren Farbstoffe ist, wie sich aus dem Dargelegten ergibt, sehr begrenzt; immerhin konnten mit den in Tab. 1 angeführten Farbstoffen, auch wenn sie zur präparativen Darstellung der Kutikula z. T. wenig geeignet sind, eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Die Färbung (Blattquerschnitte von *Clivia nobilis*) erfolgte in Lösungen 1:1000, die Zeitdauer richtete sich nach den einzelnen Farbstoffen. Bei Genvianviolett genügte eine Viertel- bis halbe Stunde, ähnlich rasch färbte Nilblausulfat; Safranin oder Neutralrot mußten einige Stunden einwirken, um brauchbare Färbungen zu erzielen. Die p_H -Stufen wurden mittels Phosphatpuffern hergestellt (Strugger 1938). Die Beobachtung erfolgte in üblicher Weise in ungefärbten Pufferlösungen.

Aus Tab. 1 erkennt man zunächst deutlich, daß der Schwerpunkt der Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen im alkalischen Bereich liegt. Dabei reicht aber die Aufnahme bei den einzelnen Farbstoffen verschieden stark in den sauren Bereich hinein. Besonders deutlich ist dies beim Chrysoidin und in etwas schwächerem Ausmaß beim Methylviolett der Fall, während Neutralrot und Safranin im sauren Bereich bedeutend schwächer gespeichert werden. Dieses Verhalten deckt sich nun mit der Löslichkeit der betreffenden Farbstoffe in Ölsäure. Nach Drawert (1940) ist Chrysoidin bei p_H 2 in Toluol-Ölsäure ebensogut löslich wie in Wasser, Methylviolett zum größeren Teil, wogegen Safranin bei p_H 2 gar nicht, bei p_H 3 nur zum kleineren Teil in die Ölsäure übergeht und Neutralrot bei p_H 2 nur in geringem Grade ölsäurelöslich ist. Diese Übereinstimmung von Ölsäurelöslichkeit mit der Fähigkeit, die Kutikula anzufärben, erlauben den Schluß, daß auch die basischen Farbstoffe innerhalb der Kutikula in der Fettphase, und zwar unter Mitbeteiligung freier Fettsäuregruppen, gespeichert werden. Dies steht wieder mit der Beobachtung in Einklang, daß basische Farbstoffe, die nur eine geringe Lipidlöslichkeit aufweisen bzw. bei denen die Löslichkeit in Ölsäure erst bei höherem p_H erheblich wird, die Kutikula überhaupt nicht oder zu-

mindest nur im stark alkalischen Bereich anfärben; hiezu zählen z.B. Anilinblau, Brillanteresylblau, Cresylechtviolett (schwache Anfärbbarkeit), Methylblau, Thionin und Toluidinblau. Gentianviolett und Nilblausulfat färben trotz guter Ölsäurelöslichkeit in p_H 2 die Kutikula in etwas geringerem Maße an als die übrigen Farbstoffe gleicher Fettlöslichkeit. Unter der Voraussetzung, daß die Unterschiede reell sind und nicht nur innerhalb der Streuung der subjektiv geschätzten Färbungsintensitäten liegen, könnte dies mit dem größeren Teilchenradius dieser Farbstoffe in Zusammenhang

Tab. 1. Farbstoffspeicherung der Kutikula frischer Blätter von *Clivia nobilis* (Blattoberseite) bei verschiedenen p_H .

| | p_H 2,2 | p_H 4,8 | p_H 6,5 | p_H 9,0 |
|-------------------|---------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Erythrosin . . . | + rosa | ++ bordeaux | + bordeaux | (±) bräunlich |
| Neutralrot . . . | (±) bräunlich | ++ braunorange | +++ braunrot | ++ braunrot |
| Gentianviolett . | + | +++ | +++ | +++ |
| Nilblausulfat . . | + hellblau | +++ dunkelblau | +++ dunkelblau | + hellblau |
| Safranin | (±) rosa | +++ rot | +++ | +++ |
| Chrysoidin . . . | ++ braungelb | +++ braun | +++ braun | + hellbraun |
| Methylviolett . . | + lila | +++ blauviolett | +++ | +++ blauviolett |

Mit alkoholfixiertem Material fallen die Färbungen etwas schwächer, aber mit den gleichen relativen Intensitätsunterschieden aus. Bei Verwendung von Erythrosin und Neutralrot spielen dabei die Farben etwas mehr ins Violette hinüber.

gebracht werden. Während Neutralrot und Chrysoidin durch Ultrafilter von 260' Filtrationsgeschwindigkeit/100 cm² glatt hindurchgehen und auch Methylviolett noch passiert, filtriert Safranin erst durch weiterporige Filter (230') gut, Gentianviolett auch durch dieses Filter nur spurenweise, während Nilblau (Chlorid) erst durch noch wesentlich gröbere Filter (110') hindurchgelassen wird (Czaja 1934). Es wäre möglich, daß der größere Teilchendurchmesser der letztgenannten Farbstoffe diese von einer Kutikularfärbung ausschließt. Auch die von Kisser zur Kutikularfärbung angegebenen basischen Farbstoffe sind, wie z. B. das Methylgrün oder das Fuchsin, leicht filtrierbare Farben. (Vgl. hierzu jedoch die Kritik Czajas 1950 a an den Versuchen Frenzels, auf Grund der Teilchengrößen metachromatischer Farbstoffe auf die Porenweite der Kutikula zu schließen.)

Die Färbung mit Neutralrot ist im stärker alkalischen Bereich wegen seiner Eigenschaft, daselbst auszufallen, schwierig. Immerhin reicht die Zeit bis zum gänzlichen Ausflocken des Farbstoffes aus, um eine mehr oder weniger deutliche Anfärbung der Schnitte zu erzielen, die besonders im Fluoreszenzmikroskop gut wahrnehmbar ist. Allerdings stellt die Kutikula auch der fluoreszenzoptischen Analyse erhebliche Schwierigkeiten entgegen. Infolge der ziemlich lebhaften blaugrünen bis gelben Eigenfluoreszenz sind schwache Sekundärfluoreszenzen namentlich ähnlicher Tönungen nicht wahrnehmbar,

andersfarbige geben Mischttöne, die oft nur schwer deutbar sind. So erscheint die mit saurer Neutralrotlösung gefärbte Kutikula von *Clivia* im Hellfeld bräunlich bis orange, im UV-Licht dagegen gelb, welche Farbe wohl zum allergrößten Teil der Eigenfluoreszenz entspricht. Bei neutraler Reaktion fluoreszieren Kutikularschichten wie Kutikula gelbbraun bis rötlich; der Farbton erinnert an die Fluoreszenz des Neutralrots in Benzol-Ölsäure. Im alkalischen Milieu tritt eine hellrotbraune Fluoreszenz auf, die wohl eine Mischfarbe einer schwachen rotbraunen bis orange Neutralrotkomponente und der gelben Eigenfluoreszenz der Kutikula, vielleicht aber auch mit einer Gelbkomponente lipoid gelösten Neutralrots darstellt. Der Färbungs- und der Fluoreszenzversuch weisen jedenfalls übereinstimmend auf eine Mitbeteiligung von Fettsäuren bei der Farbstoffspeicherung durch die Kutikula hin. Ähnliches läßt sich auch an *Yucca*, in etwas weniger deutlicher Weise an *Dasyllirion* und *Gasteria*-Arten zeigen, wobei jedesmal andere Farbnancen (verschiedene Eigenfluoreszenz der Kutikula!) auftreten.

Mit sauren Farbstoffen gelingt, wie bereits erwähnt, eine Anfärbung der Kutikula wesentlich schlechter. Mit Anilinblau, Azoblau, Congorot, Cyanol, K-Fluoreszein, Methylblau, Nigrosin, Patentblau, Säurefuchsin, Trypanblau sowie Wasserblau war keine deutliche Färbung auch bei längerer Einwirkung zu erzielen. (Schnitte von *Clivia*, *Gasteria*, *Dasyllirion*, *Yucca*): diese Farbstoffe sind auch in lipoiden Lösungsmitteln selbst bei Anwesenheit freier organischer Basen nicht oder nur schwer löslich (Drawert 1941). Mit Eosin und Erythrosin ließ sich dagegen eine Färbung erzielen, die sich vom sauren bis gegen den neutralen Bereich erstreckt. Der schwächere Ausfall der Färbung im sauersten Puffer (Tab. 1) ist allerdings nicht mit einer geringeren Durchlässigkeit resp. größeren Dichte der Kutikula im sauren Bereich (Härtel 1947) zu erklären, sondern geht zweifellos auf eine Dispersitätserniedrigung des Farbstoffes infolge der in diesem p_H -Bereich vorhandenen Tendenz, auszuflocken, zurück. Von Interesse ist ferner, daß auch im sauersten Puffer Eosin wie Erythrosin eine deutliche gelbgrüne bis rötlichgelbe Fluoreszenz der Kutikula verursacht, die sich von ihrer Primärfluoreszenz deutlich unterscheidet. Da sich nun beide Farbstoffe in rein lipoiden Lösungsmitteln (Chloroform) nur unter Farb- bzw. Fluoreszenzverlust lösen, bei Gegenwart einer organischen Base (Diamylamin) Farbe und Fluoreszenz auch in organischer Lösung beibehalten (Drawert 1941), muß daraus geschlossen werden, daß auch im sauren Bereich freie Basengruppen in der Kutikula vorhanden sein dürften. Damit wäre aber auch die bisher nur auf Grund des transpiratorischen Verhaltens erschlossene Umladbarkeit der Kutikula durch die Färbungsanalyse belegt.

Allerdings zeigt sich diese Umladbarkeit nur in einer mit zunehmender Entfernung vom Neutralpunkt immer stärker werdenden Anfärbbarkeit mit entsprechenden Farbstoffen. Der Entladungspunkt (IEP) ist wegen der geschilderten Schwierigkeiten auf diese Weise nicht mit der Schärfe erfassbar, wie dies bei Heranziehung der Durchlässigkeit (Kutikulartranspiration, Härtel 1947) der Fall war. Es zeigt sich ferner bei diesen Versuchen auch keine Andeutung einer erleichterten Farbstoffaufnahme oder Eindringfähigkeit um den Neutralbereich, wie es auf Grund des Transpirationsmaximums

zu erwarten wäre. Der färbungsanalytische Nachweis dieses Durchlässigkeitsmaximums läßt sich jedoch bei geänderter Versuchsanstellung wohl erbringen.

Rouschal und Strugger (1940) haben im Berberinsulfat einen geeigneten Farbstoff zum Nachweis des extrafaszikulären Transpirationsstromes und der Poren innerhalb der Kutikula gefunden. Die leuchtend goldgelbe Fluoreszenz dieses Farbstoffes läßt sich ferner von der Eigenfluoreszenz der Kutikula gut unterscheiden. Bei der Färbung von Schnitten in Lösungen von verschiedenem p_H ergibt sich das gleiche Ergebnis, wie wir es bereits für basische Farbstoffe kennengelernt haben. Tab. 2 gibt einen Versuch mit *Taxus baccata* wieder. In p_H 2,2 sind Kutikula und Kutikularschichten nur ganz leicht gelb-

Tab. 2. *Taxus baccata*. Fluoreszenz der Kutikula nach Behandlung mit Berberinsulfatlösungen 1:10.000 mit abgestuftem p_H (Schnitt- und Stückfärbung).

| | Schnitte, 15' fluorochromiert | Ganze Sproßteile 24 Stunden untergetaucht | Kutikulartranspiration (Transp. p_H 7 = 100) |
|-----------|-------------------------------|--|--|
| p_H 2,2 | schw. gelblich | neg., nur einzelne papillenartig vorgewölbte Epidermiszellen der Blattunterseite schwach | 43 |
| p_H 4,8 | + | fast alle Epidermiszellen der Blattunterseite mit gelbem Saum, Oberseite neg. | 66 |
| p_H 7,0 | ++ (+) | wie oben, etwas intensiver | 100 |
| p_H 9,3 | +++ | einzelne Epidermiszellen, der größte Teil jedoch neg. | 91 |

lich, im schwach sauren Bereich fluoreszieren sie erheblich stärker gelb, während die in alkalischem Bade fluorochromierten Schnitte zur Gänze intensiv goldgelb aufleuchten. Es findet sich also auch hier kein Anhaltspunkt für ein Durchlässigkeitsmaximum um den Neutralbereich herum, wie dies auch für *Taxus* festgestellt werden konnte (vgl. die Transpirationswerte in Tab. 2).

Anders wird das Bild, wenn man nicht Schnitte anfärbt, sondern ganze Sproßteile in die Farblösung eintaucht, so daß die Blattstiele aus der Flüssigkeit herausragen, sie 1—2 Tage so beläßt, nach gründlichem Abspülen (um ein Verschleppen von Farbstoff in die tieferen Gewebepartien zu verhüten) Schnitte anfertigt und diese in Puffern von gleichem p_H wie die jeweilige Farblösung im UV-Licht mikroskopiert. Die Proben aus dem sauersten Puffer zeigten im ganzen keine Sekundärfluoreszenz, lediglich einige wenige Epidermiszellen der Blattunterseite zeigen an ihrer papillenartig vorgewölbten Oberseite einen feinen gelben Saum; dieser Saum, er entspricht der mit Berberinsulfat angefärbten Kutikula, ist bei den mit Farblösungen von p_H 4,8 vorbehandelten Sprossen wesentlich intensiver und auch viel ausgedehnter; die Blattoberseite zeigt nur Primärfluoreszenz. Neutrale Lösungen führen zu einer noch stärkeren Fluoreszenz, wobei aber gleichfalls kaum ein Eindringen

des Fluorochroms in tiefere Schichten, also in die kutikularisierte Schicht oder die Epidermiszellen zu beobachten ist, einzelne gelbe Flecken rühren wohl von Verletzungen her und bleiben außer Betracht. Im alkalischen Puffer bleibt die Fluoreszenz zum größten Teile wieder aus, es finden sich nur ähnliche feine Farbsäume wie im sauren Puffer; lediglich einige Blätter zeigen noch eine stärkere, aber stets unregelmäßige, fleckenartig verteilte Gelbfluoreszenz. Es tritt also ein scharfes Maximum der Eindringfähigkeit für den Farbstoff auf, das im gleichen p_H -Bereich wie das der Kutikulartranspiration liegt. Die Unterschiede in den (subjektiv geschätzten) Fluoreszenzhelligkeiten prägen dieses Maximum wesentlich deutlicher aus als die Änderungen der Transpiration in den jeweiligen p_H -Stufen.

Die nächste Frage ist, ob dieses Verhalten auch mit anderen Farbstoffen und anderen Objekten reproduzierbar ist. An *Taxus* waren Versuche mit einer großen Zahl basischer wie saurer Farbstoffe erfolglos. Andererseits verliefen Versuche an anderen Pflanzen mit Berberinsulfat gleichfalls erfolglos. Dagegen gilt ähnliches an einer Reihe von in früheren Versuchen zur Kutikulartranspiration herangezogenen Pflanzen mit Methylviolett. Dieser Farbstoff färbt die Kutikula relativ gut an (vgl. S. 2) und wurde auch von Czaja (1934) als Musterbeispiel für das Verhalten basischer Farbstoffe gegenüber inkrustierten Zellwänden herausgestellt.

Bei der Schnittfärbung (a) nimmt die Färbungsintensität entsprechend dem oben Gesagten mit steigendem p_H gleichmäßig zu, eine Parallelität mit dem transpiratorischen Verhalten wird auch hier vermisst. Dagegen tritt beim „Eintauchverfahren“ (Stückfärbung, b) ein deutliches Maximum der Färbung auf, im gleichen p_H -Bereich, in dem auch das Transpirationsmaximum liegt. Die in Tab. 3 mitangeführten Transpirationswerte verdeutlichen den Vergleich. Bei *Rhododendron* und *Buxus* ist der Versuchsausfall allerdings infolge ungleichmäßigen Eindringens weniger klar ausgeprägt, läßt aber immer noch eine stärkere Färbung der Kutikula um den Neutralbereich erkennen. Auch mit *Taxus baccata* fällt der Versuch, die Kutikula von außen her anzufärben, zwar eindeutig, aber weit weniger eindrucksvoll aus, als dies mit Berberinsulfat der Fall ist. Umgekehrt gelingt eine Fluorochromierung der Kutikula auf diesem Wege bei den in Tab. 3 angeführten Pflanzen (außer *Taxus*) mit Berberinsulfat überhaupt nicht. Es scheint, daß verschiedene Kutikulae von außen nur durch bestimmte Farbstoffe angefärbt werden können. Auch die Blattober- und -unterseite verhalten sich dabei ganz verschieden; die Kutikula der Unterseite ist in der Regel leichter färbbar, auch zwischen der Blattlamina und der Kutikula über den Blattrippen ergeben sich bisweilen Unterschiede (*Liquidambar*). Ob solche auch zwischen gleichen Pflanzen verschiedener Standorte bestehen, konnte noch nicht einwandfrei erwiesen werden. Ebenso wenig kann die Frage, ob die Eignung eines Farbstoffes, eine bestimmte Kutikula zu färben, auf dessen chemische Eigenschaften oder aber auf dessen Teilchengröße zurückgeht, lediglich auf Grund der beiden bisher als hierfür geeignet befundenen Farbstoffe natürlich noch nicht entschieden werden. Es sei jedoch in diesem Zusammenhang daran erinnert, daß verschiedenfarbige fraktionierte Ultrafiltrate metachromer Farbstoffe jeweils nur diejenigen inkrustierten Zellwände anfärben, die

aus den betreffenden „Originallösungen“ den gleichen Farbton annehmen, andere Zellwände jedoch ungefärbt lassen, selbst dann, wenn diese durch Farbstoffe mit größerem Teilchenradius anfärbbar sind (Czaja 1930 b).

Zweifelloos haften einem subjektiven Vergleich der Färbungsintensität solcher nachträglich angefertigter Schnitte einige Unsicherheiten an. So ist es immerhin nicht ausgeschlossen, daß trotz sorgfältiger Spülung der Schnitte nach der Färbung doch beim Schneiden Farbstoff in das Innere des Blattes verschleppt werden und eine Anfärbung vortäuschen könnte, wenngleich das

Tab. 5. Verhalten der Kutikula zu Methylviolett 1:5000 bei Schnittfärbung (a) und nach Eintauchen ganzer Blätter durch 20 Stunden (b). c = Kutikulartranspiration nach gleich langer Behandlung in reinen Puffern, bezogen auf p_H 6,8 = 100.

| | | p_H 2,2 | p_H 4,8 | p_H 6,8 | p_H 9,3 |
|--------------------------------|----|-----------|-----------------------|------------------|---------------------------|
| <i>Syringa vulgaris</i> | a) | neg. | + | + - + + | ++ |
| | b) | neg. | ± (fleckig) | + fleckig | ± - neg. |
| | c) | 63 | 97 | 100 | 75 |
| <i>Rhododendron hirsutum</i> | a) | neg. | ± | + | + |
| | b) | ± - neg. | + - neg. | + (OS. u. US.) | ± - neg. |
| | c) | 38 | 81 | 100 | 47 |
| <i>Liquidambar styraciflua</i> | a) | neg. | + | | |
| | b) | ± | + (bes. Mittelrippe!) | ++ (auch Lamina) | ± - neg. (Rippe stärker!) |
| | c) | 37 | 59 | 100 | 86 |
| <i>Taxus baccata</i> | a) | neg. | ++ | +++ | +++ |
| | b) | - neg. | - neg. | + | neg. - + |
| | c) | 43 | 66 | 100 | 91 |
| <i>Buxus sempervirens</i> | a) | ± | + | +(+) | ++ |
| | b) | neg. | ± (OS.) | ± | neg. - ± |
| | c) | 68 | 75 | 100 | 84 |

mikroskopische Bild eine strenge Begrenzung der Färbung auf die äußersten Epidermisschichten, also der Kutikula, erkennen ließ; tiefer eindringende diffuse Färbung, wie sie gelegentlich zu beobachten ist, muß wohl auf Verletzungen der Kutikula zurückgeführt werden und kann daher außer Betracht bleiben. Ferner ist die Färbung doch nicht immer gleichmäßig genug, um mit Sicherheit eine subjektive Verfälschung der Beobachtungen ausschließen zu können. Ein objektiver Vergleich erschien dringend erwünscht, um ihn dem Verhalten der Kutikulartranspiration gegenüberstellen zu können. Ein solcher wurde in der Photometrierung der Lichtdurchlässigkeit von Blättern, die in Farblösungen eingetaucht wurden, gefunden. Am besten gelingt der Versuch mit *Syringa vulgaris* bzw. Blättern anderer *Syringa*-Arten. Sie wurden zur Hälfte in gepufferte Lösungen von Methylviolett 1:2000 getaucht, die andere Hälfte ragte zur Flüssigkeit heraus und blieb

unbenetzt, um später beim Photometrieren die Lichtdurchlässigkeit des gefärbten Teiles auf die des unbehandelten beziehen und so den störenden Einfluß der verschiedenen Blatttransparenz eliminieren zu können. Die Bestimmung erfolgte mit einem photoelektrischen Kolorimeter (Bio-Photo-Col der Fa. Helige) unter Verwendung von weißem, ungefiltertem Licht. Die Blätter wurden zwischen zwei Objektträger geklemmt und so an Stelle des Reagensglases in den Apparat eingeführt, daß das Licht das Blatt von der Ober- zur Unterseite durchstrahlte. Die Durchlässigkeit kann an einem Meßinstrument direkt in Prozenten abgelesen werden. Tab. 4 gibt einen derartigen Versuch wieder.

Tab. 4. *Syringa vulgaris*. Lichtdurchlässigkeit nach 24stündigem Aufenthalt der Blattspreiten in Methylviolettlösung 1:2000 bei verschiedenem p_H

| | Farblösung | Kontrolle: reiner Puffer | |
|-----------|--|--|-------------------------|
| | Durchlässigkeit in % des unbehandelten Blatteils | Durchlässigkeit in % des unbehandelten Blatteils | Kutikular-Transpiration |
| p_H 2,2 | 75 | 100 | 23,2 mg/g. h |
| " 4,8 | 61 | 108 | 37,5 " |
| " 7,0 | 53 | 100 | 37,0 " |
| " 9,3 | 78 | 83 | 28,0 " |

Die Werte der ersten Kolonne zeigen eindeutig, daß aus der Farbstofflösung neutraler Reaktion der meiste Farbstoff aufgenommen wird, die Blätter erscheinen schon äußerlich wesentlich blau- bzw. violettstichiger als die aus den anderen Lösungen. Daß diese Durchlässigkeitsänderung ausschließlich auf Farbstoffaufnahme und nicht auf sonstige Veränderungen der Blätter unter der Einwirkung des Puffers zustande kommt, lehrt ein Vergleich mit den Kontrollen; reine Puffer ändern wohl ein wenig die Transparenz des Blattes, aber in einem ganz anderen Sinne als bei gleichzeitiger Anwesenheit von Farbstoff (es tritt ein schwaches Transparenzmaximum bei p_H 4,8 auf). Auch eine immerhin mögliche Schädigung durch den Farbstoff (Methylviolett ist recht giftig) kann für den Versuchsausfall nicht ausschlaggebend sein. Eine derartige Schädigung müßte doch im sauren Puffer am stärksten sein, da sich in diesem die schädigende Wirkung des Farbstoffes und der H-Ionen addieren und in einer verstärkten Anfärbung äußern müßten. Dagegen ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung der Farbstoffaufnahme mit der Kutikulartranspiration nach Behandlung mit reinem Puffer (vgl. Härtel 1947); entsprechend unseren früheren Erfahrungen liegt auch hier ein Maximum der Kutikulartranspiration im schwach sauren bis neutralen Bereich und deckt sich so mit der erhöhten Farbstoffaufnahme. Der trotz gleicher Wasserabgabe niedrigere Wert der Transparenz nach Behandlung mit Methylviolettlösung von p_H 7 gegenüber der Probe aus p_H 4,8 erklärt sich wohl durch Veränderungen im Farbstoff; die Schnittfärbungen haben gezeigt, daß die Speicherung im wesentlichen an das Vorhandensein von Farbmole-

külen gebunden ist; ihre Menge nimmt aber bei basischen Farbstoffen wie Methylviolett mit steigendem p_H zu, wodurch es bei höherem p_H trotz gleicher „Kutikulardichte“ zu einer verstärkten Anfärbung kommen muß.

Auffallend ist allerdings, daß die gefärbten Blätter gerade um den Neutralbereich eine niedrigere Kutikulartranspiration zeigen als im extrem sauren oder alkalischen Bereich, sich demnach gerade umgekehrt wie die Blätter aus den reinen Puffern verhalten. Ob es sich dabei um einen Verstopfungseffekt der submikroskopischen Poren durch den eingedrungenen Farbstoff handelt oder um eine ähnliche Umkehrung des Reaktionssinnes durch „versuchsfremde“ Ionen (als solche wären in diesem Falle die des Methylvioletts anzusehen), wie sie an Blättern bereits nachgewiesen werden konnte (Härtel 1951), wurde nicht weiter untersucht.

Es ergibt sich nun die Frage, ob der gleiche Versuch auf die Salze der Hofmeisterschen Ionenreihe ausgedehnt werden kann und sich dabei fär-

Tab. 5. *Syringa vulgaris*. Ionenabhängigkeit der Farbstoffaufnahme und der Kutikulartranspiration (Methylviolett 1:2000, 24 Std.).

| | Farblösung Durchlässigkeit in % des unbehandelten Blattes | Kontrolle, reine Salzlösung | |
|-------------------|---|---|------------------------|
| | | Durchlässigkeit in % des unbehandelten Blattes | Kutikulartranspiration |
| <i>n</i> /50-LiCl | 64 | 103 | 49,3 mg/g · h |
| <i>n</i> /50-NaCl | 61 | 100 | 56,0 mg/g · h |
| <i>n</i> /50-KCl | 58 | 101 | 59,5 mg/g · h |

berisch eine ähnliche Ionenabhängigkeit nachweisen läßt, wie dies bei der Kutikulartranspiration der Fall ist. Darüber konnten bislang nur ganz wenig Versuche angestellt werden, da die Vegetationsperiode bereits zu Ende gegangen war und geeignetes Versuchsmaterial nicht mehr zur Verfügung stand; sie mögen aber in diesem Zusammenhang bereits angeführt werden. Die Blätter kamen, wie oben beschrieben, in Li-, Na- und KCl-Lösungen (*n*/50), denen Methylviolett in einer Konzentration 1:2000 zugesetzt wurde; zur Kontrolle lief nebenher ein Versuch mit Salzlösungen ohne Farbstoffzusatz. Nach 24 Stunden wurden die Blätter wie bereits beschrieben photometriert.

Auch in diesem Versuch entspricht einer höheren Kutikulartranspiration eine erhöhte Farbstoffaufnahme. Der Effekt ist zwar nicht sehr stark, aber der Richtung nach eindeutig. Die Wirkung der Anionen läßt sich auf diese Weise leider nicht prüfen, da der Farbstoff bei Zusatz von Bromid oder Jodid allmählich ausflockt. Auf fluoreszenzoptischem Wege konnte mittels der auf S. 7 geschilderten Methodik an *Taxus*-Nadeln mit Berberinsulfat eine etwas stärkere Fluoreszenz an den vorgewölbten Epidermiszellen der Blattunterseite beobachtet werden, doch waren die Helligkeitsunterschiede nicht so ausgeprägt wie in den p_H -Versuchen und vielfach auch durch starke individuelle Streuung verdeckt. Auf eine ausführlichere Wiedergabe dieser Versuche sei daher verzichtet, zumal Tab. 5 Analoges objektiv darstellt.

Überblicken wir die vorgebrachten Ergebnisse, so erscheint der aus dem transpiratorischen Verhalten gezogene Schluß, daß die Kutikula ein Ampholytoid im Sinne Michaelis darstellt, auch färberisch bestätigt. Die Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen steigt mit dem p_H an, während sie bei sauren Farbstoffen (soweit überhaupt eine Färbung möglich ist) gegen den alkalischen Bereich abnimmt. Fluoreszenzoptische Untersuchungen konnten nun zeigen, daß an der Speicherung sowohl freie Fettsäuren als auch organische Basenreste beteiligt sind, wenn auch nur zu einem geringen Teil. Der größte Teil des durch die Kutikula aufgenommenen Farbstoffes wird als Farbmolekül in lipoider Phase festgelegt, für den Färbungsausfall ist die Menge der in der Farbflotte vorhandenen Farbsalz- oder Farbbasenmoleküle (hauptsächlich jedoch der ersten) maßgebend. Daraus erklärt sich auch das Übergreifen der Färbbarkeit über den Neutralpunkt bzw. das Vorhandensein von einer relativ breiten Zone, in der eine Färbung durch saure und basische Farbstoffe möglich ist. Diese Zone darf deshalb nun noch nicht als isoelektrische Zone angesprochen werden, da die Aufnahme der Farbstoffe, wie gesagt, nicht elektrostatisch, sondern durch Löslichkeitsspeicherung erfolgt. Im Verhalten der Farbstoffe an der verletzten Kutikula, wie sie bei Schnittfärbung vorliegt, ist also kein Anhaltspunkt für ein Maximum der kutikularen Wasserabgabe entsprechende erhöhte Aufnahmefähigkeit der Kutikula zu erkennen. An intakter Kutikula ist jedoch im gleichen p_H -Bereich, in dem die kutikulare Wasserabgabe maximal ist, eine stärkere Anfärbbarkeit der Kutikula zu erkennen. Es handelt sich dabei nur um einen Eintritt des Farbstoffes in diese und nicht um einen Farbstoffdurchtritt. Der lipoid gelöste Farbstoff hat nicht die Möglichkeit, in die hydrophilen Schichten der Epidermisaußenwand überzugehen. Dabei zeigt sich auch, daß, soweit bisher untersucht, eine weitgehende Spezifität besteht; Berberinsulfat vermag nur *Taxus*-Nadeln anzufärben, Methylviolett dringt in die Kutikula einiger anderer Versuchspflanzen mit offenbar artspezifischer Intensität ein, während die Kutikula einer großen Zahl anderer Pflanzen überhaupt ungefärbt bleibt. Als Erklärung für dieses Verhalten darf vielleicht die Teilchengröße der Farbstoffe herangezogen werden. Denn aus dem Vergleich der Schnitt- und der Stückfärbung muß der Schluß gezogen werden, daß die Färbung durch einen Porenmechanismus gesteuert wird, wobei die Weite der Poren von der Größe der Ladung der Membrankolloide abhängt. Entsprechend dem, was bereits an Hand der Transpirationsbeeinflussung durch Ionen ausgeführt worden ist (Härtel 1951), nimmt die Ladung mit zunehmender Entfernung des p_H vom isoelektrischen Punkt (besser der isoelektrischen Zone) gleichfalls zu, womit die Wasserhüllen mächtiger werden und die Wegsamkeit der Kutikula sowohl für Wasser als auch für Farbstoffe sich verringern. Für lipoidlösliche Farbstoffe resp. Farbmoleküle kommt dazu noch die erschwerte Zutrittmöglichkeit zur Fettphase hinzu. In der isoelektrischen Zone dagegen sind die Wasserhüllen minimal, die Wegsamkeit in der hydrophilen Phase groß bzw. der Zutritt der Farbmoleküle zur Fettphase erleichtert. Daß sich diese Ladungsänderungen nicht durch elektrostatische Färbung mit Diachromen bzw. Fluorochromen direkt nachweisen lassen, liegt jedenfalls in der geringen Zahl freier Säure- bzw.

Basengruppen, die den Farbstoff nicht über die zur Wahrnehmung nötigen Dichte speichern können. Inwieweit die hiemit bestätigte Umladbarkeit der Kutikula für die Physiologie bzw. Ökologie des Wasserhaushaltes der Pflanzen von Bedeutung sein kann, darüber hat sich Härtel (1947, 1951) geäußert.

Zusammenfassung

Die pflanzliche Kutikula läßt sich an Schnittpräparaten mit basischen Farbstoffen vorzugsweise in alkalischer Lösung anfärben, während saure Farbstoffe (sofern diese überhaupt dazu imstande sind) vor allem im sauren Bereich gespeichert werden. Maßgebend für die Speicherung ist das Vorhandensein von Farb- (Salz-) Molekülen. Bei ihrer Festlegung spielen zweifellos freie Fettsäurereste sowie (im sauren Bereich) freie organische Basengruppen eine Rolle. Der Kutikula kommen demnach ampholytoide Eigenschaften zu, wie sie bereits aus dem Verhalten der Kutikulartranspiration erschlossen wurden. Die unverletzte Kutikula ganzer Blätter vermag dagegen (basische) Farbstoffe am leichtesten aus neutraler Lösung aufzunehmen; einer hohen Kutikulartranspiration entspricht demnach eine leichte Färbbarkeit „von außen her“, womit der vom Ionenmilieu abhängige Porenmechanismus der Kutikula auch auf färbungsanalytischem Wege bestätigt erscheint.

Literatur

- Anderson, D., 1928: Struktur und Chemismus der Epidermisaußenwand von *Clivia nobilis*. Jahrb. wiss. Bot. 69, 501.
- Beck v. Managetta, G., 1904: Sitz. Ber. Deutsch. naturw. med. Ver. f. Böhmen, „Lotos“, Nr. 7 (zit. nach Strasburger).
- Brauner, L., 1930: Untersuchungen über die Elektrolytpermeabilität und Quellung einer leblosen natürlichen Membran. Jahrb. wiss. Bot. 73, 513.
- Buscalioni, L., 1898: Sudan III und seine Verwendung in der botanischen Mikrotechnik. Bot. Cbl. 76, 389.
- Chodat, R., 1911: Principes de Botanique. Paris.
- Czaja, A. Th., 1930a: Über das Verhalten der Membranen von Pflanzenhaaren zu organischen Farbstoffen. Planta 10, 424.
- 1930b: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. I. Substantive Farbstoffe. Planta 11, 582.
- 1934: Dasselbe. II. Basische Farbstoffe. Planta 21, 531.
- Drawert, H., 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
- 1941: Dasselbe. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 35, 21.
- Fischer, H., 1912: Botanisch-mikrotechnische Mitteilungen. Ztschr. wiss. Mikrosk. 29, 63.
- Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives. New York-Amsterdam.
- Frenzel, P., 1929: Über die Porengrößen einiger pflanzlicher Zellmembranen. Planta 8, 642.
- Géneau de Lamarliere, L., 1906: Sur les membranes cutinisées des plantes aquatiques. Rev. gén. Bot. 18, 289.

- Guignard L., 1890: Journ. de Bot. 4, 447 (zit. nach Strasburger).
- Härtel, O., 1947: Über die pflanzliche Kutikulartranspiration und ihre Beziehungen zur Membranquellbarkeit. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, 156, 57.
- 1950: Wirkungen von Ionen auf die Wasserdurchlässigkeit des primären und sekundären Hautgewebes pflanzlicher Organe. Protoplasma 39, 364.
- 1951: Ionenwirkungen auf die Kutikulartranspiration von Blättern. Protoplasma 40.
- Höfler, K., 1946: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. Anz. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., 1946, Nr. 7, 41.
- Kisser, J., 1928: Zur Färbung kutinierter Zellmembranen. Ztschr. wiss. Mikrosk. 45, 165.
- Lagerheim, G., 1902: Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 19, 525.
- Lee, B., and Priestley, J. H., 1924: The plant cuticle, I: Its structure, distribution and function. Ann. Bot. 38, 525.
- Linsbauer, K., 1930: Die Epidermis. In: Handb. d. Pflanzenanatomie Abt. I, T. 2, Bd. IV., Berlin.
- Meyer, M., 1938: Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen. Protoplasma 29, 552.
- Michaelis, L., 1929: Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin.
- Plaut, M., 1910: Untersuchungen zur Kenntnis der physiologischen Scheiden bei den Gymnospermen, Equiseten und Bryophyten. Jahrb. wiss. Bot. 47, 121.
- Richter, O., 1905: Fortschritte der botanischen Mikrochemie. Ztschr. wiss. Mikrosk. 22, 369.
- Rouschal, E., und Strugger, S., 1940: Der fluoreszenzoptisch-histochemische Nachweis der kutikularen Sekretion und des Salzweges im Mesophyll. Ber. deutsch. Bot. Ges. 58, 50.
- Spek, J., 1943: Eine optische Methode zum Nachweis von Lipoiden in der lebenden Zelle. Protoplasma 37, 49.
- Strasburger, E., und Koernicke, M., 1915: Das botanische Praktikum. Jena.
- Strugger, S., 1938: Fluoreszenzoptische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 32, 253.
- Zeiger, K., 1938: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. Dresden.
- Zimmermann, A., 1892: Die botanische Mikrotechnik. Tübingen.
- Zweihaum, J., 1923: Sur la coloration des graisses dans la cellule vivante. C. r. Soc. Biol. 89, 254.

Über den Aufbau der Wandungen von *Cladophora glomerata* im Lichte der verfeinerten Methoden der Lichtmikroskopie

Von

Hermann und Hugo Ziegenspeck, Augsburg

Mit 3 Textabbildungen

(Eingelangt am 10. April 1951)

Cladophora glomerata gedeiht in rasch fließenden Bächen, wo sie flatternde Bewegungen ausführt. Wenn auch mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes und der Dichroskopie (Ziegenspeck 1939) Quermicellierung der primären, dünnen Lamelle und Längsmicellierung der derben oder sehr derben, sekundären Lamelle festgestellt wurden, so kann das noch nicht diese sehr starke mechanische Beanspruchung erklären. Andere Methoden (Frey-Wyssling 1938) haben besonders lange Makromoleküle über $2,5 \mu$ bei den *Siphonocladiales*, zu denen diese polyenergide Alge gehört, festgestellt. Es lag daher in Ausdehnung der Ergebnisse bei Fasern und Holzfasern (Ziegenspeck 1951) nahe, die Methoden der verfeinerten Lichtmikroskopie zu verwenden.

Angelehnt an die Methodik der Elektronenmikroskopie wurden folgende Wege gewählt, weil uns die Metallbeschattung nicht zugänglich war:

1. Einbettung an im Brechungsexponenten ansteigende Medien: Gemische von Phenol mit Glycerin, Milchsäure, Paraffinöl, Cädax, Immersionsöl u. dgl. Es wird angestrebt, einen Brechungsexponenten zu erreichen, der den der ganzen Wandung fast erreicht oder wenig überschreitet, weil so eine Differenzierung innerhalb der Wandung ermöglicht wird und zugleich die Reflexion an der Grenze der Wand I ausgeschaltet ist.

2. Auseinanderziehen der Einzelelemente der Wandung durch beginnende oder schwache Quellung in Natronlauge, Chlorzinklösungen und selbst kurzes Verweilen in Kupferoxydammon. Es ist denkbar, daß ein Teil der Wand, die „Füllung“, bereits verquollen wäre, wenn die dichter gepackten Elemente noch wenig angegriffen sein würden.

3. Die Quellung zumal in Kupferoxydammon, Chlorzinksalzsäure, Schwefelsäure usw. wird etwas weiter getrieben. Durch Auswaschen in Ammoniak oder verdünnten Säuren je nach dem Angewandten kann dieser Vorgang unterbrochen werden.

Zum Beobachten wird man Methode 2 mit 1 kombinieren. Aufhellen mit Eau de Javelle und Herauslösen von Inhaltsstoffen und Ölen mit Alkohol,

Härtosol, Aceton und Äther sorgen für das Entfernen störender Inhaltsstoffe. Stärke kann durch kurzes Kochen in verdünnter HCl entfernt werden.

Die Beobachtungsmethoden sind folgende:

A. Die Präparate werden zwischen gekreuzten Nikols mit sehr intensiver, aber gekühlter Beleuchtung durch Niedervoltlampen oder Bogenlampen betrachtet. Die kristallisierten Elemente ergeben Additionsfarben hellgrau bis weißlich (oder auch Subtraktionsfarben dunkelgrau bis schwarz), je nach der Stellung zur Schwingungsebene des Polarisators. Sie heben sich dann heller leuchtend (oder schlechter dunkler) von dem schwach grau antingierten Untergrunde ab. Man kann auch eine ganz schwache Glimmerplatte



Vergrößerung 1 : 1000 Dunkelfeld $1/7$ Imm. Leitz Periplan 10 Leica
1 mm = 1 μ .

Abb. 1. Die Polarisationssebene (Pfeil) liegt quer zum Faden, daher nur Fila der Primärwand sichtbar. Phenol mit 10% Glyzerin.

etwa $\lambda/8$ bis $\lambda/10$ einschalten, manchmal hilft ganz schwaches Abweichen der Nikolstellung von der Vertikalen. Als Objektive wählte ich mit größtem Vorteile $1/2$ Fl von Leitz, weil dieses verhältnismäßig hohe numerische Appertur mit großer Tiefenschärfe vereinigt. Die Ausschaltung von allzu intensiver Einstrahlung seitlicher Objekte usw. nimmt man mit einer Apperturblende vor. Das Objektiv Immersion F/100 mit Apperturblende von Reichert leistet ebenfalls sehr gute Dienste.

B. Dunkelfeld ohne oder besser mit Azimutblende wirkt mit 1–3 vereinigt ganz eigenartig. Nach Ausschalten der Reflexe an der Wandoberfläche durch die Einbettung kommen die Brechungsunterschiede innerhalb der Wandung zur Geltung. Das Dunkelfeldlicht ist zudem infolge der

Spiegelungen polarisiert. Die kristallinen Elemente der Membran wirken nun als zweiter Nikol; wir können durch Drehen der Präparate entweder die längs- oder quergerichteten Einzelteile sichtbar machen. Mitunter erhöht man die Deutlichkeit der Bilder durch Aufsetzen eines Analysators oder durch die Apperturblende des Objektivs, wodurch Überstrahlung vermieden wird.

C. Das Phasenkontrastverfahren im Verein mit 1—3 läßt innerhalb der Wandung mehr oder weniger deutlich die Einzelelemente erkennen. Oft jedoch sind die Bilder noch kontrastarm. Da die Interferenz (Ziegenspeck 1951) von der Kristallnatur abhängig ist, so bekommt man durch Aufsetzen eines Analysators oder Unterlegen eines Polarisators sehr deutliche Bilder. Parallel zur Schwingungsebene ist die Interferenz am stärksten. Ich möchte das Verhalten als „Diinterferenz“ bezeichnen. Es ist also eine ähnliche Erscheinung wie die Absorption einzelner Wellenlängen, die zum Dichroismus führt. Die Kombination mit Dichroismus nach sanfter Anfärbung durch Coriphosphin oder auch Akridinorange erhöht die Kontraste noch mehr. Das Einschalten von geeigneten Kontrastfiltern (Blaugrün oder Gelbgrün) ergibt zuletzt die besten Bilder.

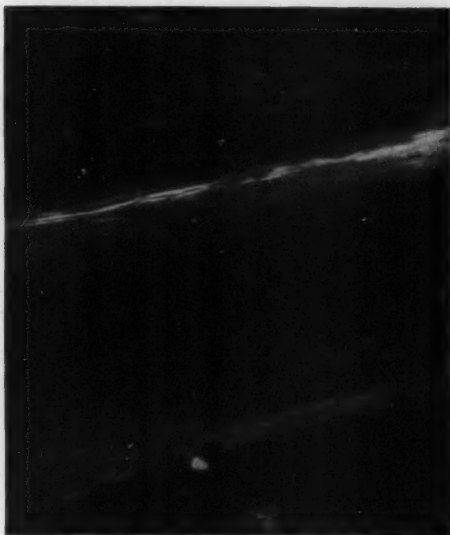


Abb. 2. Da die Polebene längs zum Faden streicht, sind die Fila der sekundären Wand sichtbar, wie oben.

Es gelang uns mit der Kombination der Methoden 1—3 mit A—C feine und feinste Strukturelemente innerhalb der Wandung deutlich nachzuweisen. Wir betonen, daß bereits Methode 1 allein zum Erkennen führte, was wegen der nur geringfügigen Eingriffe von besonderer Wichtigkeit ist.

Die Bilder nach 2 ergeben sehr deutlich mit A—C vereint die Einzelelemente von etwas unter $1\ \mu$ Dicke. Die Primärlamelle hat quergerichtete, etwas kürzere Teilchen, die wir Fila (sing. Filum = Faden) nennen, da diese Bezeichnung noch nicht abgegriffen und handlich ist.

Im Dunkelfelde B, Abb. 1 und 2, weniger gut nach Verfahren A, erkennt man, daß die Fila an den Enden feinst zugespitzt und fädig ausgezogen sind. Diese Anteile sind $0,1\ \mu$ und darunter dick. Wir verweisen auf die Photogramme A und B, die mit Leica aufgenommen sind und nach Feinkornentwicklung auf 1 : 1000 vergrößert wurden. Diese Verfilzung der feinsten Fäden

bemerkt man am deutlichsten, wenn man die Fäden zerreißt. Sie ragen zum Teil frei auf dem Abrisse heraus und liegen haarscharf an der Grenze der Wahrnehmung: Zumal die Azimutblende und Verdrehen des Tisches läßt sie aufleuchten und als in den Dimensionen des feinen Goldkolloides (also vielleicht bis etwa $100-60 \text{ \AA}$) liegend abschätzen.

Nach 3 kann man Auflösung der Wandung in ein Gewirr derber, meist etwas verbreiteter Fila betrachten (Photogramm 3 linke Seite). Die Breite entspricht etwa 1μ gleich 10.000 \AA . Deutlich bemerkt man im Präparate, besser als im Photo festzuhalten ist, die Auflösung der Fila zu noch feineren Gebilden, die etwa die Dicke der ausgezogenen Enden der Fila, $0,1 \mu$ und darunter, haben. Sie brechen noch deutlich doppelt. Die Verfeinerung führt zu Gebilden von etwa $0,05 \mu$, was 500 \AA entspräche.

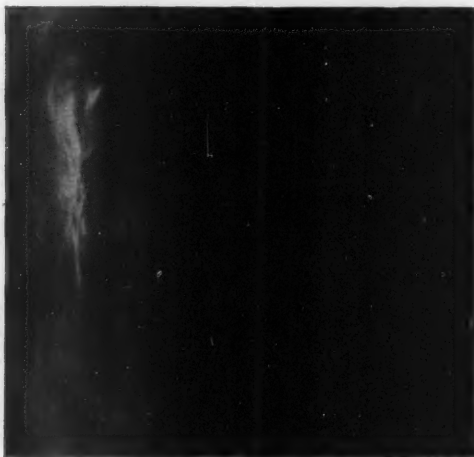


Abb. 3. Quellung in Kupferoxydammon. Nach Unterbrechen in Phenolglyzerin. Links die hellen gequollenen Fila im Verbande, rechts Zerteilung der freiliegenden Fila zu Mikrofilbrillen.

Im Sinne der Elektronenmikroskopie (Frey-Wyssling und Mühlethaler 1950) haben wir in den Fila das vor Augen, was man dort als Mikrofilbrillenbündel bezeichnet.

Die feineren Elemente sind Mikrofilbrillen selber oder gehen an sie heran. Die Länge der Fila ist $10, 15, 20 \mu$ und darüber, Mikrofilbrillen etwa $5, 8, 10 \mu$. Wir betonen, daß das Lichtmikroskop auch in diesem Falle viel von den mit dem Elektronenmikroskop sichtbaren Dingen infolge seiner hohen numerischen Apertur erreichen läßt, weil

bei Eigenleuchten die Abbildungsmöglichkeit nach dem Dunkelfeldprinzip erweitert ist. Voraussetzung ist aber das Auseinanderzerren der Struktur.

Die Betrachtung bei schwächeren Vergrößerungen (Ziegenspeck 1951 a) lehrt nun weiter, daß die Fila nicht genau längs verlaufen, sondern in steilen Spiralen stehen, die über die erst nachträglich eingezogenen Zellgrenzen hinweggehen. Die Fäden der Algen erhalten damit eine Federfestigung, wobei Spannen und Entspannen der Feder das wiegende Fluten hervorruft. Eine derartige Bauart ist nun sowohl den Fasern der höheren Pflanzen und Moose eigen wie dem *Phycomyces* unter den Pilzen (Frey-Wyssling 1950). Wir nennen sie spirofilat.

Es muß nun die weitere Frage gestellt werden: Ist diese Textur aus Fäden der völlig enthüllte Bau der Wandung? Bereits der Versuch, die

Präparate rasch, z. B. in Paraffinöl, einzubetten, lehrt, daß noch ein Zusatz gemacht werden muß; denn es tritt ein nicht mehr ausgleichbares Schrumpfen und Zusammensinken ein. Aus dem Inhalte gehen die Füllflüssigkeiten viel zu schwer heraus, als es ein solcher Filzbau erwarten läßt. Es muß noch eine Füllsubstanz innerhalb des Filterfilzes vorhanden sein. Sei es, daß noch feinere Fibrillen vorhanden sind, sei es, daß nicht kristallisierte Zellulosen im Sinne von Herman vorliegen.

Zur Vervollkommenung unserer Untersuchung lag es nahe, den IEP mit den Methoden von Höfler und Pecksieder (1947) durch Einbetten und Färben in gepufferter Akridinorangelösung nachzuweisen.

Absichtlich haben wir Membranpräparate nach Aufhellen mit Eau de Javelle und Ausziehen mit Alkohol, Aceton und Äther gewählt, um sicher nur Wandungen zu untersuchen. Ein Waschen in Essigwasser und in destilliertem Wasser diene zu völliger Beseitigung adsorbierter Kationen.

Die Wandungen ergaben die kennzeichnende Kupferrotfärbung zwischen p_H 4,8 und 8 bei Beobachtung im Reichertschen Fluoreszenzmikroskop. Das Blaulicht ergibt strahlendere Bilder, die zur Untersuchung auf Fila verwendet wurden. Mit dieser Färbung konnten jedoch solche nicht aufgefunden werden, auch wenn man von der Apperturblende Gebrauch machte. Offenbar beteiligt sich die ganze Wandung an dem Zustandekommen der Färbung des IEP. Unterhalb p_H 3,5 sieht man eine mehr weißlich-grünliche Fluoreszenz, bei p_H 3,5 ist die Färbung mehr gelblich bis gelblichorange. Bei p_H 11 ist ebenfalls nur eine schwache orange Fluoreszenz vorhanden.

Das Ergebnis ist insofern wertvoll, als der Bereich der Speicherung der kupferroten Fluorochromphase nicht nach Art der höheren Pflanzen ist, sondern sich an den der Chitinwände der Pilze anschließt. Wenn auch nach den vorliegenden Angaben *Cladophora* wie alle *Siphonocladiales* und *Siphonales* kein Chitin, also kein N in der Zellwand führen sollen, so verhalten sich offenbar die Wandstoffe ähnlich dem Chitin der Hymenomyceten. Da nach den Ergebnissen der Serologie (Ziegenspeck und Mez 1929) die Entwicklungslinie von den *Siphonocladiales* über die *Siphonales* zu den Phycomyceten, *Protoascomycetinae* zu den Hymenomyceten verläuft, so könnte man die Lage des IEP als eine Bestätigung auf anderem Wege anschauen, sofern dahinggerichtete, ausgedehntere Untersuchungen im gleichen Sinne verlaufen würden.

Zusammenfassung

Mit verfeinerten Methoden läßt die Lichtmikroskopie bei *Cladophora glomerata* einen eufiliaten Aufbau der Membran nach Art der Fasern der höheren Pflanzen erkennen, wie er auch mit dem Elektronenmikroskop und Metallbeschattung abbildbar ist. Der IEP liegt im Bereiche desjenigen der Membran der Pilze, nicht desjenigen der Zellwand der höheren Pflanzen.

In den angegebenen Schriften finden sich weitere Literaturangaben:

Frey-Wyssling, 1938: Submikroskopische Morphologie. Protoplasma-Monographie 15.

Frey-Wyssling, 1949: Desgl. in Fortschritte der Botanik XII.

— 1950: Der submikroskopische Feinbau von Chitinzellwänden. Vierteljahrber. Natforsch. Ges. Zürich 95, 45—52.

Höfler-Pecksieder, 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Öst. bot. Ztg. 94.

Mez-Ziegenspeck, 1929: Der serodiagnostische Königsberger Stammbaum.

Mühlethaler, 1950: Die Struktur der Zellwand. Orion 5, 26—30.

Ziegenspeck, 1959: Die Differenzierung der Einzelzelle. Protoplasma 32.

— 1951: Der submikroskopische Bau des Holzes. Handbuch der Mikroskopie II.

— 1951a: *Cladophora*. Forschungsberichte des Natw. Vereins von Schwaben und Neuburg.

Untersuchungen zur Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (Goeze) mit Hilfe des Zeitrafferfilms¹

(Aus dem Institut für Kinematische Zellforschung, Frankfurt a. M.)

Von

Wilhelm Schwöbel

Mit 14 Textabbildungen

(Eingelangt am 15. Mai 1951)

| Inhalt | Seite |
|--|-------|
| I. Einleitung | 21 |
| II. Besondere technische Hilfsmittel | 24 |
| III. Versuche und Beobachtungen (Zeitrafferlaufbild und Teilbildanalyse): | |
| 1. Beobachtung der Granulabewegung (GB) im Zeitrafferlaufbild | 28 |
| 2. Beschreibung der Granulabewegung | 31 |
| 3. Glitschbewegung | 32 |
| 4. Beobachtungen an zentrifugierten Eiern | 33 |
| 5. Beobachtungen an gepreßten Eiern | 35 |
| 6. Beobachtungen an Eiern bei verschiedenen Temperaturen | 36 |
| 7. Beobachtungen an Eiern unter Luftabschluß | 37 |
| 8. Beobachtungen an Eiern während der Vorkernvereinigung bis zur ersten Teilung | 37 |
| 9. Bemerkungen zur Geschwindigkeitsbestimmung geraffter Bewegungs- vorgänge | 37 |
| 10. Ergänzende Darstellung weiterer cyto-dynamischer Vorgänge | 39 |
| IV. Messung der Bewegungsgeschwindigkeit der Granula | 40 |
| V. Meßergebnisse: | |
| 1. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) und Temperatur | 47 |
| 2. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) während Karyogamie und Mitose | 48 |
| 3. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) in Eiern unter Luftabschluß | 50 |
| 4. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) in zentrifugierten Eiern | 50 |
| VI. Theoretischer Teil | 50 |
| VII. Zusammenfassung der Ergebnisse | 53 |

I. Einleitung

Als in der Zeit um 1910 zum ersten Male von Biologen der Mikro-Zeitrafferfilm zur Erfassung sehr langsamer Bewegungsvorgänge des Zellgeschehens,

¹ Vorstehende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. W. Kuhl als Dissertation im Institut für Kinematische Zellforschung in Frankfurt a. M. angefertigt.

besonders der Zellteilung, angewandt wurde, geschah dies aus dem Bestreben, diese an sich bekannten Vorgänge als ein wirklich dynamisches Geschehen darzustellen. Nicht immer findet dabei die erstaunliche Tatsache Erwähnung, daß, durch die Anwendung der Zeitraffung sichtbar geworden, eine bis dahin unbekannte Bewegung in Erscheinung trat. Die körnchenförmigen Protoplasmaeinschlüsse führen nämlich tanzende Bewegungen aus, und es entsteht allgemein der Eindruck, daß sich der gesamte Zellinhalt in Bewegung befindet. Eine eingehendere Beachtung finden diese in Wahrheit sehr langsamen Bewegungsvorgänge erst bei späteren Untersuchern, die mit dem Zeitrafferfilm arbeiten.

Bei der Beschreibung dieser Bewegungsvorgänge wird im folgenden, um Wiederholungen zu vermeiden, nicht mehr von Fall zu Fall darauf hingewiesen, daß sich die Darstellungen und Geschwindigkeitsangaben stets auf das geraffte Filmlaufbild beziehen.

So findet Fauré-Fremiet (1913), daß sich bei einer raschen Vorführung eines Zeitrafferfilms von der Entwicklung des *Parascaris*-Eies dessen große Protoplasmagranula in schneller Bewegung befinden. Diese Bewegung der Granula ist völlig ungeordnet und erinnert an die Bewegung Brownscher Teilchen. Als ihre Ursache nimmt Fauré-Fremiet Protoplasmabewegungen an und unterscheidet diese ungeordnete Bewegungsweise scharf von den bei zahlreichen Zellen zu beobachtenden Protoplasmaströmungen.

Er betont ferner, daß diese durcheinanderwimmelnden Bewegungen der Granula viel zu langsam sind, um bei einer direkten Beobachtung des Eies im Mikroskop wahrgenommen zu werden. Diese Bewegungen sind außerdem keinesfalls für das *Parascaris*-Ei charakteristisch, sondern bereits am Seeigeei mit Hilfe des Zeitrafferfilms beobachtet worden.

Frommolt (1934), der die Furchung des Kanincheneies untersucht, spricht von einem starken Strömen, von einem Wogen und Wallen des Eiprotoplasmas, und er findet gleichzeitig, daß in geschädigten Eizellen diese Bewegungen mit dem Absterben der Eizelle an Intensität abnehmen. Auch auf Mehrzellenstadien zeigt das Protoplasma der Blastomere eines normalen Eies eine wesentlich ausgeprägtere Bewegung als das von Blastomeren geschädigter Zellen.

Pomini (1937) findet, daß sich eine Schädigung von Spulwurmeiern durch Radiumstrahlen vor allem in einer Verlangsamung der Bewegung der lichtbrechenden Granula äußert.

v. Möllendorff (1937) spricht von „Körnchenbewegung“, die er in Zellen von Gewebekulturen (Kaninchenfibrocyten) beobachtet und deren Intensität sich durch Zusatz bestimmter chemischer Stoffe oder durch intensive Belichtung als experimentell beeinflussbar erweist.

Eingehendere Beachtung findet dieses Phänomen dann bei Kuhl (ab 1937), der es als „Granulabewegung“ (GB) bezeichnet und aus dessen zahlreichen Veröffentlichungen sich eine genauere Vorstellung über diese Bewegungsvorgänge gewinnen läßt.

Seine Aussagen sind auf die vergleichenden Zeitrafferfilm-Untersuchungen der Eier von Vertretern verschiedener Tiergruppen gestützt, im wesent-

lichen Mollusken, Nematoden, Echinodermen, Anneliden, Fischen, Säugern, und die GB läßt sich danach mit Recht als charakteristisch für das Bild einer normalen, nicht geschädigten Eizelle bezeichnen.

Die Bewegung der Granula erinnert nach Kuhl im grafted Filmlaufbild bei unvoreingenommener Betrachtung an die Bewegung Brownscher Teilchen. Er nimmt jedoch an, daß hier keine derart ungeordnete Bewegungsweise der Granula vorliegt, sondern vermutet im Gegenteil, daß von den Granula mehr oder weniger geordnet bestimmte Bahnen innerhalb sehr kleiner Zellareale zurückgelegt werden. Innerhalb dieser Areale, deren Durchmesser für das Ei von *Psammochinus miliaris* mit $2-3\mu$ angegeben wird, sollen möglicherweise lokalisierte Strömungen des Hyaloplasmas die Bewegung der Granula bewerkstelligen. Wie auch bei bekannteren Bewegungsvorgängen des Protoplasmas werden die Granula damit lediglich als Indikatoren für Bewegungserscheinungen der plasmatischen Grundsubstanz in Anspruch genommen. Trotzdem weist Kuhl auf die Schwierigkeit bei der Entscheidung der Frage hin, „wer hier wen bewegt“, das Hyaloplasma die Granula oder umgekehrt, und definiert die GB deshalb auch vorsichtig, das kausale Moment zunächst bewußt außer acht lassend, als die nur unter Zeitraffung sichtbare Ortsveränderung der Protoplasmaeinschlüsse intakter Zellen.

Nach den untersuchten Formen zu schließen, wird vermutet, daß die Geschwindigkeit der GB zum wenigsten „gruppenspezifisch“ ist. Ihre Intensität ist etwa gleich groß im Ei der weißen Maus bei 460facher, den Eiern von *Psammochinus* und *Pomatoceros* bei 70facher und in Proto- und Deutomerit von Gregarinen schon bei 4facher Geschwindigkeit. In den Eiern einiger Regenwurm-nematoden kann diese Bewegung schließlich so schnell sein, daß sie neben den starken hier auftretenden Protoplasmaströmungen ohne Zeitraffung erkennbar wird.

Auch auf verschiedenen Entwicklungsstadien lassen sich Unterschiede der Intensität erkennen. Im unbefruchteten Ei der weißen Maus verläuft die GB deutlich langsamer als im befruchteten, eventuell sich teilenden Ei, und im Ei von *Pomatoceros* ist vor jeder Teilung eine kurzfristige erhöhte Bewegungsintensität zu beobachten.

Diese Geschwindigkeitsänderungen im normalen Zellgeschehen sind jedoch weit weniger auffällig als die durch Zellschädigung hervorgerufenen. So ist in geschädigten Eizellen schon erstaunlich früh eine verringerte Bewegungsintensität ihrer Granula zu bemerken, Stunden, u. U. sogar Tage, bevor ihre Schädigung durch morphologische Veränderungen, Ausbleiben oder Pathologie der Teilung etc. erkenntlich wird.

Ist eine Schädigung so tiefgreifend, daß keine weitere Teilung mehr erfolgt und die Zelle abstirbt, so wird die GB immer langsamer und hört dann gänzlich auf. Der Augenblick des gänzlichen Aufhörens der Bewegung wird dabei als der Eintritt des Zelltodes aufgefaßt.

Diese bisher beschriebenen Intensitätsänderungen betreffen gleichmäßig die Bewegung aller Granula im gesamten Protoplasma, mit Ausnahme der Kern- oder Spindelräume. Während sich die GB der Spindelregion beim Seeigel von der Bewegung der übrigen Granula nicht unterscheidet, wird für

das Ei der weißen Maus, das Ei von *Pomatoceros triqueter* und die Eier einiger Regenwurm-nematoden eine temporäre, auf die Spindelregion beschränkte, intensivere GB beschrieben.

Schließlich werden im perivitellinen Raum des *Psammecinus*-Eies stark lichtbrechende Granula unbekannter Herkunft beobachtet, deren Bewegungsform und Geschwindigkeit sich nicht von derjenigen der Granula im Eiprotoplasma merklich unterscheidet. Auf Grund dieser Ähnlichkeit von Bewegungsform und Bewegungsgeschwindigkeit wird auf die Möglichkeit hingewiesen, auch eine ähnliche Viskosität von Eiprotoplasma und perivitelliner Flüssigkeit annehmen zu können.

Auf dem IV. Internationalen Zellforschungkongreß ist im Anschluß an den bereits erwähnten Vortrag von v. Möllendorff (1927) diese Möglichkeit, die Bewegungsintensität der Körnchen als ein Maß für die Viskosität zu benutzen, ebenfalls diskutiert worden. Während ein Teil der Diskussionsredner der Annahme zuneigte, in dieser Körnchenbewegung eine „gezwungene Brownsche Bewegung“ zu sehen, vertrat besonders Levi nachdrücklich auf Grund eigener Beobachtungen die Auffassung, daß es sich hier um gänzlich andere, mutmaßlich durch Protoplasmaströmungen hervorgerufene Bewegungsvorgänge handelt, die nicht mit der Brownschen Molekularbewegung (BMB) verwechselt werden sollten.

Soweit die Beschreibung der GB nach Angaben der Literatur.

Es sollen nun die bei der einleitenden Darstellung berührten Fragen eingehender verfolgt und untersucht werden. Da die hierfür wahrscheinlich günstigsten Untersuchungsobjekte, die Eier mariner Formen, nicht zur Verfügung standen, schien das Ei vom Pferdespulwurm wegen seiner großen, relativ nicht zu zahlreichen Granula sowie seiner Verfügbarkeit während des ganzen Jahres für die Beobachtung am geeignetsten. Verwendung fanden nur die reifen Eier aus den Anfangsteilen der Uteri, die bei 3–5°C im Kühlschrank in durch Kochen sauerstofffrei gemachtem Wasser nicht länger als einen Monat aufbewahrt wurden.

Die extreme Langsamkeit der in Rede stehenden Bewegungsvorgänge machte methodisch als wichtigstes Untersuchungsmittel die Anwendung des Zeitrafferfilms erforderlich, da mit ihm allein die Darstellung der GB gelingt. Mit seiner Hilfe wird es dann möglich, die Bewegung der Granula im einzelnen zu analysieren und ihr Verhalten im normalen sowie experimentell beeinflussten Zellgeschehen zu verfolgen.

II. Besondere technische Hilfsmittel

Die Technik der Filmaufnahme selbst, d. h. die Behandlung und Anordnung des Präparates sowie die Behandlung des Untersuchungsmaterials, erforderte einige technische Sondereinrichtungen, die im folgenden deshalb kurz erläutert werden.

Die übliche Weise, die Eier als Deckglaspräparat unter das Mikroskop zu bringen, verbietet sich hier meist aus verschiedenen Gründen, besonders wenn ein und dasselbe Ei mehrere Stunden lang beobachtet werden soll. Für das Gelingen einer Zeitrafferfilmaufnahme ist es wichtigstes Erfordernis, daß

das Material während der Aufnahme absolut ruhig liegt, und zweitens, daß es sich zur ungestörten Entwicklung stets in sauerstoffreichem Wasser befindet. Am ehesten ist dies noch mit einem zwei- oder dreiseitig mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparat zu erreichen, an dessen freiem Rand vorsichtig von Zeit zu Zeit frisches Wasser zugesetzt wird. Trotzdem kommt es dabei immer wieder vor, daß das Ei weggeschwemmt wird und der ganze Versuch damit mißglückt. Bei Temperaturen über 30° beginnt das Paraffin außerdem zu erweichen, und die Gefahr, daß das ganze Deckglas abschwimmt, wird so groß, daß man damit keine sich über mehrere Stunden hinziehenden Aufnahmen mehr riskieren kann.

Es wurde deshalb eine andere Methode, die nicht mit diesen Mängeln behaftet ist, angewandt. Sie besteht darin, daß eine Tauchkappe (Abb. 1), an ihrer Unterseite das Deckglas tragend, mittels zweier Stangen von den beiden Assistenten eines Mikromanipulators exakt nach jeder Richtung beweglich in eine das Material enthaltende, flache Glasschale mit optisch einwandfreiem Boden eintaucht. Die Deckgläser wurden dazu mit Wasserglas an die mit verschiedenen weiten Bohrungen versehenen, abschraubbaren Bodenstücke der Tauchkappe aufgeklebt, eine Befestigungsweise, die auch bei den höchsten praktisch nötigen Temperaturen zu verwenden ist. Gleichzeitig ist durch diese Anordnung die Möglichkeit gegeben, durch vorsichtiges Senken der Tauchkappe einen beliebig starken Druck auf die Eier auszuüben oder durch eine Verschiebung in der Horizontalen die Eier zu rollen und sie so in eine für die Aufnahme günstige Lage zu bringen. Besonders gestattet das ganz leichte Pressen der Eier einen anders nicht zu bewerkstelligenden gründlichen Wechsel des Untersuchungsmediums während der Aufnahme, ohne daß dabei eine Verschiebung der Eier zu befürchten wäre. Ein bequemes Arbeiten mit dieser Anordnung ist jedoch nur dann möglich, wenn Tubus wie auch Mikroskoptisch in ihrer Höhenlage mit einem Trieb verstellbar sind. An dem benutzten Panphot (Leitz) mußte ein solcher Grobtrieb für den Tubus nachträglich eingebaut werden.

Die außerordentliche mechanische Festigkeit der Schale des Spulwurmeies schloß von vornherein bei der Untersuchung mechanischer Einflüsse die Anwendung von Mikromanipulationen an der Zelle aus. Lediglich die Wirkung von mechanischem Pressen sowie der Einfluß der Zentrifugalkraft auf die GB ließen sich beobachten.

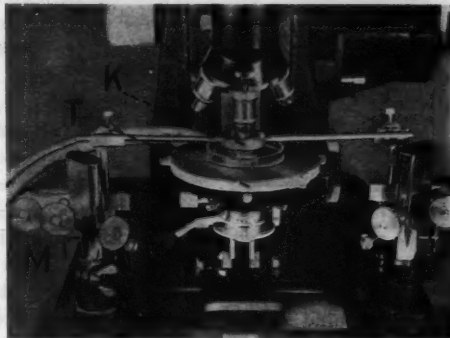


Abb. 1. Anordnung des Präparates, wie sie bei Temperaturversuchen benutzt wurde. Panphot (Leitz) mit Tauchkappe *K* am Chambersschen Mikromanipulator *M* (Leitz). Ferner Temperiertisch *T* mit zu- und abführenden Schlauchleitungen.

Mechanisches Pressen eines Eies unter dem Mikroskop mit so großem Druck, daß es gegebenenfalls platzt, gelingt mit der oben beschriebenen Tauchkappe nicht. Um dauernd beobachtet werden zu können, muß das Ei nämlich genau in der Mitte des Deckglases unter der Tauchkappe liegen, also gerade da, wo sich das Deckglas am stärksten aufwölben kann. Dadurch wird gerade auf die Eier im Zentrum der geringste, nicht ausreichende Druck ausgeübt.

Es wurde deshalb eine andere Tauchkappe entwickelt, bei der diese Verhältnisse gerade umgekehrt liegen (Abb. 2). Sie ist mit einem stramm sitzenden Stück Gummischlauch direkt mit dem Objektiv verbunden und hat seitlich einen kurzen Luftzuführungsstutzen. Füllt man nun den Raum zwischen Objektiv und Innenfläche der Tauchkappe mit Preßluft, so wölbt sich das Deckglas nach außen durch, und zwar im Zentrum am stärksten, also da, wo der größte Druck benötigt wird.

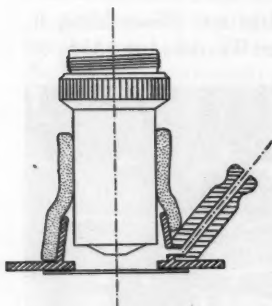


Abb. 2. Preßtauchkappe
im Schnitt.

Durch entsprechendes Regulieren des Luftdruckes läßt sich so der von dem Deckglas auf die Eier ausgeübte mechanische Druck sehr fein und bequem bis zum Platzen des Eies steigern und gleichzeitig die Wirkung ungestört beobachten.

Den Einfluß der Zentrifugalkraft auf das Verhalten der Granula zu verfolgen, erforderte eine leistungsfähige Zentrifuge. Da für den hier gegebenen Fall nur 1 bis 2 Tropfen Flüssigkeit zentrifugiert werden mußten, konnte, wie schon von früheren Untersuchern (Beams, Weed, Pickels 1933), auf die erste und ursprüngliche Ausführung einer preßluftangetriebenen Ultrazentrifuge (Henriot et Huguenard 1925, zit. nach Svedberg 1940) zurückgegriffen werden.

Geringe Anschaffungs- und Betriebskosten bei erstaunlich hoher Leistung lassen dieses System für bestimmte Zwecke als äußerst praktisch erscheinen. Der Rotor mit einem äußeren Durchmesser von 16 mm (wirksamer Radius 6 mm) erreicht bei 5 atü Wasserstoffgas eine Umdrehungszahl von etwa 5400 sek. Die Zentrifugalfeldstärke entspricht dabei dem etwa 500.000fachen Betrag der Schwerkraftstärke. Für die vorstehenden Versuche genügt der Betrieb mit 2–3 atü Luft vollkommen, womit schon nach etwa fünf Minuten langer Zentrifugierungsdauer die in Abb. 6 dargestellte Schichtung zu erreichen war. Den Raum zur Aufnahme des zu zentrifugierenden Materials stellt, wie aus Abb. 3 ersichtlich, die Unterfräsung der zentralen Bohrung dar. Ein dichter Verschluss dieses Raumes ist nicht nötig und auch nicht möglich, weil die Deformationen des Materials während des Betriebes Schraubenverschlüsse nicht zulassen. Der Luftverbrauch bei diesem kleinen Rotortyp ist so gering, daß sich die Verwendung von Preßluft aus Stahlflaschen rentiert und eine Kompressoranlage wie bei größeren Typen meist nicht nötig wird.

Durch die sich bei dem Austritt aus den Düsen entspannende Luft wird der Rotor samt seinem Inhalt stark abgekühlt, ein Nachteil, da die damit verbundene Viskositätszunahme des Materials die gewünschte Sedimentation durch die Zentrifugalkraft hemmt. Um diesen Nachteil zu beheben und um eine Zentrifugierung bei

jeder gewünschten Temperatur durchführen zu können, wurde die Betriebsluft durch einen regulierbaren Heizwiderstand vorgewärmt. Mit einem Thermoelement läßt sich dann unmittelbar über dem Rotor die Temperatur der entspannten Luft und damit auch hinreichend genau die des zentrifugierten Materials bestimmen. Einen Querschnitt durch die ganze Anlage gibt Abb. 4, die besonders deshalb ausführlich beschrieben wurde, weil sie in dieser einfachen Form auch für andere biologische Objekte mit Vorteil zu verwenden sein dürfte.

Die von vornherein anzunehmende Abhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit der Granula von der Temperatur machte es erforderlich, die Eier während der Beobachtung zunächst auf einer bequem kontrollierbaren konstanten Temperatur zu halten, und ferner, um die Abhängigkeit als solche zu untersuchen, die Temperatur gegenüber der Zimmertemperatur beliebig zu erniedrigen oder zu erhöhen. Für den gegebenen Fall bedeutet dies einen Temperatur-Regelbereich von etwa 0–80° C.

Dazu erwiesen sich die wenigen bisher verwendeten Systeme elektrisch heizbarer oder auch durch Kohlensäure abkühlbarer Objektische als nur bedingt geeignet.

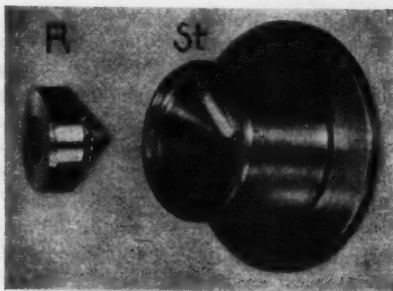


Abb. 3. Stator (St) und Rotor (R) der Ultrazentrifuge.

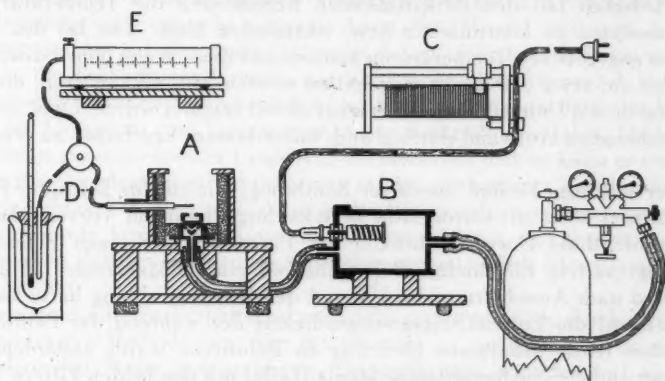


Abb. 4. Schnitt durch die benutzte Ultrazentrifugenanlage.

A: Zentrifuge in gummiausgekleidetem Schutzgehäuse. B: Luftvorwärmer mit Regulierwiderstand C. D: Thermoelement zur Temperaturmessung der entspannten Luft über dem laufenden Rotor. E: Lichtstrichgalvanometer (Hartmann & Braun).

Die Temperaturregelung erfordert dauernde Kontrolle, die exakte Messung der Temperatur ist unbequem, und eine Konstanzhaltung über längere Zeiträume bei wechselnder Wärmeableitung durch das Mikroskop, besonders bei höheren Temperaturen, ist, wenn überhaupt möglich, nur sehr mühsam zu erreichen.

Als äußerst zuverlässig und bequem im Gebrauch erwies sich dagegen ein von dem Wasser eines Hoeppler-Ultrathermostaten durchströmter, als Hohlkörper ausgebildeter Mikroskoptisch (abgebildet bei Kuhl 1949 b). Er entspricht in seinen Außenmaßen dem dreh- und zentrierbaren abnehmbaren Teil eines runden Leitzschen Mikroskoptisches, jedoch hohl mit zwei Stützen für die zu- und abführenden Schlauchleitungen. Die 14 Liter Thermostatenflüssigkeit zirkulieren dann, auf $\pm 0,02^\circ$ konstant gehalten, mit einer Geschwindigkeit von etwa 5 Litern pro Minute durch diesen „Temperiertisch“. Hohe Temperaturkonstanz durch die Wärmeträgheit der großen durchströmenden Wassermenge auch bei wechselnder Wärmeableitung durch veränderte Anordnung der Präparate auf dem Temperiertisch, rasche Temperaturangleichung sowie bequeme Temperaturkontrolle gestatten ein zuverlässiges Arbeiten mit dieser Anordnung.

Die tatsächliche Temperatur im Präparat wurde thermoelektrisch mit einer feinen, 0,1 mm starken Thermosonde direkt unter dem an der Tauchkappe befestigten Deckglas gemessen. Die Temperaturdifferenz zwischen Präparat und der den Tisch durchströmenden Thermostatenflüssigkeit beträgt dabei bei Zimmertemperatur immerhin etwa 5° bei 50° Badtemperatur und etwa 10° bei 80° Badtemperatur. Es ist dazu erforderlich, zwischen Objektträger und die planpolierte Oberfläche des Temperiertisches etwas Wasser oder bei höheren Temperaturen Paraffinum liquidum als Kontaktmittel zu bringen. Diese Temperaturdifferenz erwies sich bei gleichen Versuchsanordnungen als sehr konstant, so daß auf eine derartige Temperaturkontrolle mit der Thermosonde im Präparat meist verzichtet werden konnte und lediglich mit den entsprechenden Korrekturen die Temperatur des Thermostaten zu kontrollieren bzw. einzustellen blieb. Die bei den Versuchen angegebenen Temperaturen konnten auf diese Weise ohne Schwierigkeit bis auf etwa $\pm 1^\circ$ genau eingehalten werden, eine Genauigkeit, die für die gegebenen Untersuchungen als ausreichend erachtet wurde. Ohne größeren technischen Aufwand dürften auch kaum bessere Ergebnisse zu erzielen sein.

Der mögliche Einfluß intensiver Belichtung, wie sie für Zeitraffer-Filmaufnahmen nötig ist, wurde nicht berücksichtigt, nachdem Vorversuche die außerordentliche Unempfindlichkeit des *Parascaris*-Eies gegen Belichtung bestätigt hatten. Einstündige Belichtung mit einer Bogenlampe bei 25 cm Abstand nach Ausschaltung des UV und der Wärmestrahlung hatte keinen Einfluß auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der während der Belichtung nur eben feucht gehaltenen Eier. Für die Belichtung wurde außerdem die weit schwächere Niedervoltlampe Monla (Leitz) mit den beiden Filtern VG 4 und GG 13 (Schott) benutzt.

III. Versuche und Beobachtungen (Zeitrafferlaufbild und Teilbildanalyse)

1. Beobachtung der Granulabewegung (GB) im Zeitrafferlaufbild

Als Erstes und Nächstliegendes wurde versucht, durch subjektive Beobachtung Näheres über das Phänomen der GB in Erfahrung zu bringen. Daß

auch im Ei vom Pferdespulwurm tatsächlich diese Bewegungen, sogar, in sehr auffälliger Weise, vorkommen, war aus älteren Zeitrafferfilmen über die Entwicklung dieses Eies eindeutig zu ersehen (Fauré-Fremiet 1913, Kuhl 1931, unveröffentlicht, Autrum 1939).

Dazu sei bemerkt, daß, wenn im folgenden von Granula schlechthin gesprochen wird, darunter stets die großen Dottergranula von durchschnittlich etwa 1μ Durchmesser zu verstehen sind. Ihre chemische Zusammensetzung sowie ihre Bedeutung für die Zelle werden hier nicht betrachtet; es sei nur erwähnt, daß sie die spezifisch leichtesten Zelleinschlüsse darstellen.

An sich ist es üblich, nur die kleinsten, spezifisch schwersten Cytoplasma-Einschlüsse von nur $0,1-0,3\mu$ Durchmesser als Granula zu bezeichnen und von den großen als Dotterkörnern (auch Ölkugeln) zu sprechen. Von dieser Unterscheidung wird kein Gebrauch gemacht, um die Einheitlichkeit der Darstellung mit der Anwendung des Begriffes GB zu wahren, dem lediglich der Wortsinn der Bezeichnung „Granula“ zugrunde liegt und worunter einfach alle körnchenförmigen Einschlüsse lebender Protoplasten zu verstehen sind. Betrachtet werden also im *Parascaris*-Ei von den in ihm enthaltenen Granula vorwiegend nur die Dotterkörner bzw. die von ihnen ausgeführte GB.

Betrachtet man ein Ei unter stärkerer Vergrößerung unter dem Mikroskop, so läßt sich auch bei ausdauernder intensiver Beobachtung keine Bewegung der Granula erkennen. Merkt man sich aber z. B. die charakteristische Lagerung von 3 oder 4 Granula, die vielleicht als die Eckpunkte irgendeiner geometrischen Figur leicht zu behalten sind, so zeigt sich schon nach $\frac{1}{2}$ Minute, wenn man erneut ins Mikroskop blickt, daß die regelmäßige Figur in irgendeiner Weise zu einer unregelmäßigen geworden ist. Die Granula haben also in der Zwischenzeit eine Verlagerung erfahren, wenn auch eine sehr langsame und von sehr geringen Ausmaßen. Wartet man noch 1 bis 2 Minuten, so hat sich das ganze Bild meist derart verändert, daß man schon einzelne der beobachteten Granula gar nicht mehr identifizieren, d. h. aus der Masse der übrigen herauskennen kann. Dies ist besonders dann der Fall, wenn ein Granulum eine Verlagerung in der Senkrechten erfährt. Erschien es zunächst gegenüber seiner Umgebung als besonders hell, so kann es wenig später mit ihr gleich und darauf sogar infolge veränderter Lichtbrechung besonders dunkel werden, ohne dabei in der Waagerechten verlagert worden zu sein. Gerade durch diesen Umstand ist es zu erklären, daß man trotz der Langsamkeit der Bewegungen ein Granulum so erstaunlich schnell aus dem Auge verliert.

Diese geschilderten Verhältnisse machen es auch unmöglich, durch irgendeine subjektive Methode den Weg der Granula zu verfolgen und in einer befriedigenden Weise aufzuzeichnen. Es wurde dies zunächst mit einem Zeigerokular versucht und die Verschiebung eines Granulums gegenüber der Spitze des Zeigers aufgezeichnet. Bequemer geht dies mit einem Zeichenapparat, ohne daß man aber bessere Ergebnisse erzielt. Naheliegend ist es auch, das von einem Projektionsmikroskop auf Papier entworfene Bild eines Eies zu benutzen und hier einfach den Bahnen der Granula auf dem Papier nachzufahren. Dazu sind die so erhaltenen Projektionsbilder aber nicht scharf und hell genug, und außerdem hat man damit die im Vorstehenden beschriebene Schwierigkeit prinzipieller Art, die Granula auch längere Zeit

zuverlässig zu identifizieren, keineswegs überwunden. Außerdem ergibt sich so nur der Weg eines oder bestenfalls nur sehr weniger Granula. Es wird auf diese Weise keine Entscheidung möglich, ob hier eine Strömung im Protoplasma oder eine unregelmäßige Bewegung der Granula vorliegt oder ob sogar lediglich eine Drehung des ganzen Eies um eine unbekannte Achse stattgefunden hat.

Auf Grund dieser Methode gewonnene Ergebnisse gestatten im allgemeinen nur Aussagen, ob überhaupt Bewegungen vorliegen oder nicht. Trotzdem wurde früher wiederholt aus derart erhaltenen „Granulawegen“ auf Protoplasmaströmungen, Zellbewegungen und ähnliches geschlossen. Einige dieser zum Teil mit besonderen Termini belegten Bewegungsvorgänge ließen sich mit exakteren Methoden überhaupt nicht nachweisen. Dies belegt die Unzulänglichkeit solcher subjektiven Methoden hinreichend, von denen im folgenden deshalb kein Gebrauch gemacht wurde.

Als einzige exakte und den Gegebenheiten gerecht werdende Methode bleibt somit nur die Anwendung des Zeitrafferfilms übrig. Erst die mit seiner Hilfe scheinbar vergrößerte Bewegungsgeschwindigkeit der Granula macht ihr dynamisches Verhalten direkt beobachtbar und gestattet auch mühelos die Entscheidung, ob GB, Strömung, Drehbewegung des Eies oder ähnliches vorliegt. Die Eier wurden dazu unter normalen wie experimentell beeinflussten Bedingungen zunächst etwa $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 80facher Raffung gefilmt. Dazu müssen in der Minute 12 Bilder aufgenommen werden, die sich noch bequem mit der Hand drehen lassen.

Auf Einzelheiten der Filmaufnahmetechnik wird hier nicht eingegangen. Sie ist einschließlich der dazu nötigen Apparate ausführlich bei Kuhl (1949 b) dargestellt.

Für die Versuche wurden nur Eier von normalem morphologischem Aussehen und wiederholt kontrollierter normaler Entwicklungsfähigkeit benutzt. Sie wurden stets mindestens 1 Stunde vor Aufnahmebeginn dem Kühlschrank entnommen und bereits während dieser Zeit nach Zusatz von sauerstoffhaltigem Wasser bei der endgültigen Aufnahmetemperatur aufbewahrt, um eine Temperaturangleichung zu ermöglichen. Das für die Versuche benutzte Material war üblicherweise nie älter als ein Monat, obwohl sich die Eier bei der gebräuchlichen Aufbewahrungsmethode im Kühlschrank bei 5–5° C nach einer mindestens doppelt so langen Aufbewahrungszeit gleichmäßiger zu entwickeln pflegen.

Im einzelnen kamen zunächst Eier bei verschiedenen Temperaturen, die jeweils 10° auseinanderlagen, zur Beobachtung. Es sollte so Aufschluß über eine mögliche Temperaturabhängigkeit der GB erhalten werden.

Das gleiche geschah mit Eiern, deren Inhalt durch starkes Zentrifugieren geschichtet worden war. Es ergab sich dadurch die Möglichkeit, das dynamische Verhalten der nach ihren spezifischen Gewichten getrennten Zelleinschlüsse isoliert zu beobachten, was in der nicht zentrifugierten Zelle nicht möglich ist. Die Masse der leichtesten Granula, die hier als Ball am zentripetalen Pol ausgetreten sind, beginnt nach dem Zentrifugieren wieder „zurückzuwandern“ und sich gleichmäßig im Protoplasma zu verteilen. Gerade beim „Zurückwandern“ wird es dabei auch möglich, einzelne Granula so

lange einwandfrei zu beobachten, wie es bei normaler Verteilung der Einschlüsse nie gelingt.

Ferner wurden Eier während der Aufnahme mit der oben beschriebenen „Preßtauchkappe“ verschieden stark gepreßt, zum Teil bis zum Platzen der Eischale, wobei der Eiinhalt austrat.

Schädigungen durch chemische Einflüsse wurden wegen der außerordentlichen Widerstandsfähigkeit der Eihüllen nicht untersucht, besonders deshalb, weil die Stoffe zum Teil nur sehr langsam durch die Eischale hindurchdringen. Dies erfordert lange Beobachtungs- und Aufnahmezeiten, was durch den damit verbundenen hohen Filmverbrauch kostspielig wird. Außerdem lieferten zur Lösung der gestellten Aufgaben die anderen Versuche ausreichendes Tatsachenmaterial. Es sei in diesem Zusammenhang lediglich ein Versuch erwähnt, bei dem die Eier unter Sauerstoffabschluß zur Beobachtung kamen.

Schließlich wurde auch das Verhalten der Granula im normalen, experimentell nicht beeinflussten Zellgeschehen verfolgt, und zwar während der Entwicklung vom Vorkernstadium bis zur vollendeten ersten Teilung. Die nun von Teilung zu Teilung abnehmende Zellgröße erschwerte die Beobachtung in zunehmendem Maße, weshalb Mehrzellenstadien zunächst keine Berücksichtigung fanden.

2. Beschreibung der Granulabewegung

Aus diesen Versuchen ließ sich nun in Hinblick auf die langsamen intraprotoplasmatischen Bewegungen folgendes ersehen:

Der Eindruck, den die GB im gerrafften Filmlaufbild bietet, läßt sich in der Tat mit nichts besser als der Bewegung Brownscher Teilchen vergleichen. Sie erfüllen mit gleichmäßigem Gewimmel den ganzen Zellraum, die Vorkerne ausgeschlossen, die erst nach Zentrifugieren gut sichtbar werden.

Die Beschreibung bezieht sich auch hier wieder stets auf das gerraffte Filmlaufbild, worauf, um Irrtümer zu vermeiden, nochmals nachdrücklich hingewiesen sei.

Es lassen sich keinerlei Strömungen oder gerichtete Bewegungen mehrerer Granula gleichzeitig erkennen, ganz im Gegenteil, je öfter man das gerraffte Filmlaufbild betrachtet, um so mehr entsteht der Eindruck völliger Unregelmäßigkeit.

Die Intensität der GB läßt mit Ausnahme der Kern- oder Spindelräume keine regionalen Unterschiede erkennen. Bis unmittelbar an die Zellmembran führen die Granula ihre Bewegung aus, und soweit dies wegen der unvermeidbaren Unschärfe des Zentrums zu beurteilen ist, auch unmittelbar bis an die Grenzen der Vorkerne. Die Vorkerne selbst erscheinen im Leben als glasige Kugeln, die keinerlei Strukturen oder Einschlüsse und so auch keine Bewegung in ihrem Innern erkennen lassen. Ist eine Polstrahlung ausgebildet, so sind bestenfalls die Granula in ihrer unmittelbaren Nähe in der Bewegung gehemmt; die Masse der weiter peripher gelegenen Granula bleibt, soweit sich dies dem Laufbild entnehmen läßt, davon gänzlich unbehelligt.

Die Polstrahlung ist hier im Leben weniger gut erkennbar als bei anderen Eiern, z. B. dem Seeigel-Ei, bei dem sie nach Kuhl im Leben als eine mehr oder weniger starre, nahezu lineare Anordnung von Granula definiert wird. Unter Zeitraffung lassen die derart angeordneten Granula die typische GB vermissen und treten deshalb im gerafften Filmlaufbild noch deutlicher als bei unmittelbarer Betrachtung aus ihrer unregelmäßig bewegten Umgebung hervor.

Diese Beobachtung läßt sich auch auf die Verhältnisse im *Parascaris*-Ei übertragen, allerdings mit der Einschränkung, daß die Polstrahlung hier weit weniger deutlich in Erscheinung tritt. Der auf die Bewegung der Granula hemmend wirkende Einfluß der Strahlung erstreckt sich nicht bis zur Zellmembran, so daß die Granula einer kugelschalenförmigen peripheren Protoplasmazone von dieser Wirkung deutlich unbeeinflusst bleiben.

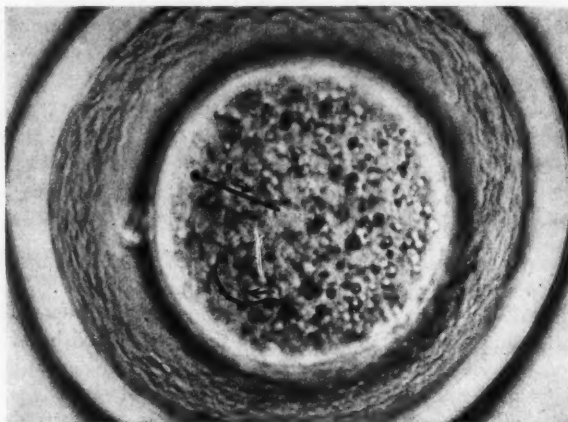


Abb. 5. Glitschbewegung. Die in kurzen Zeitabständen hintereinander beobachteten Wege zweier Granula sind in die Vergrößerung eines Film-Teilbildes eingetragen.

5. Glitschbewegung

Gelegentlich lassen sich einzelne Granula beobachten, die, nachdem sie geraume Zeit ihre üblichen verschlungenen Bahnen beschrieben haben, plötzlich, pfeilschnell wie es im Laufbild aussieht, geradlinig durch die Masse der anderen wimmelnden Granula hindurchschießen, um dann ebenso plötzlich wieder mehr oder weniger auf der Stelle tanzend ihre typische Bewegungsweise zu zeigen.

Die bei derart plötzlichen, weiträumigen Bewegungen beschriebenen Wege können bis zu 20μ lang sein und brauchen durchaus nicht vollkommen geradlinig zu verlaufen. Sie können Krümmungen nach verschiedenen Seiten aufweisen und sind, im ganzen gesehen, verhältnismäßig häufig zu beobachten. Besonders, wenn man den Film auch einmal rückwärts laufen läßt, entdeckt man meist neue derartige auffallende Bewegungen, die beim Vorwärtslauf der Beobachtung entgangen waren. In Abb. 5 sind die eben be-

schriebenen Wege von zwei Granula, die kurz hintereinander beobachtet wurden, in die Vergrößerung eines Film-Teilbildes eingetragen.

Eine ähnliche Erscheinung ist schon lange bei der BMB bekannt, wo bisweilen ein Teilchen ruckartig einen ungewöhnlich großen Weg in gerader Linie zurücklegt. Sie wird meist als „Glitschbewegung“ bezeichnet, eine Benennung, die aus weiter unten dargelegten Gründen auch für die formal gleichen Bewegungserscheinungen der hier vorliegenden GB angewandt wird.

Gerade im Anschluß an diesen Vergleich sei nochmals auf den prinzipiellen Unterschied der Bewegungsgeschwindigkeit der Granula bzw. Teilchen bei GB oder BMB hingewiesen. Ein Brownsches Teilchen führt seine Bewegungen so schnell aus, daß man seine zitternden Bahnen bei subjektiver Betrachtung im Mikroskop kaum mit dem Auge verfolgen kann. Dagegen lassen die Granula im Spulwurmei bei subjektiver Betrachtung überhaupt keine Bewegung erkennen.

4. Beobachtungen an zentrifugierten Eiern

Weitere Ergebnisse lieferte die Beobachtung der Granula in zentrifugierten Eiern. Dabei werden die großen, spezifisch leichtesten Dottergranula als „Ball“ dicht beieinanderliegend aus dem Ooplasma herausgedrängt. In dieser dichten Lagerung lassen sie keinerlei Bewegung erkennen. Erst nach dem Zentrifugieren, wenn sie sich wieder langsam in der Eizelle verteilen, beginnen zunächst die Granula der aufgelockerten Randzone mit ihren typischen tanzenden Bewegungen, die dann schließlich mit zunehmender Auflockerung der Granulamasse auch auf die übrigen übergreifen.

Dieses Einziehen des Granulaballes scheint zunächst elastisch durch die Eimembran zu geschehen, bis die Kugel-

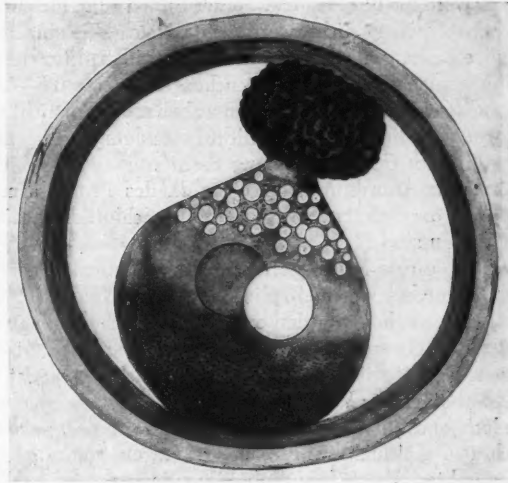


Abb. 6. Zentrifugiertes Ei. Oben zentripetaler Pol mit der als „Ball“ ausgestoßenen spezifisch leichtesten Schicht der Dottergranula. Darunter die Sphaerulae; anschließend eine einschlußlose Schicht, in der die Vorkerne liegen. Als letztes am zentrifugalen Pol die kleinen Granula, die BMB ausführen.

Es kann auch bei geschädigten Zellen erfolgen, von

denen nach dem Zentrifugieren lediglich die Kugelgestalt angenommen wird, ohne daß sich die Granula wieder verteilen. Als Ausdruck des Dehnens der Eimembran durch den austretenden Ball lassen sich auch deutliche Längsfalten der Eimembran an dem schmalen Verbindungsteil zwischen Ball und Eizelle beobachten, die mit dem Einziehen des Balles wieder verstreichen. Ferner wird die Eimembran an dieser Stelle in ihrer Struktur gestört. Besonders nach längerem Zentrifugieren treten an dieser Stelle nach dem völligen Einziehen des Balles bruchsackartige Protuberanzen auf, die schnell, fast subjektiv beobachtbar hervortreten. Sie werden wiederholt eingezogen und wieder ausgestoßen, was in einem Falle bis zum völligen Abklingen eine Stunde lang zu beobachten war.

Die GB in den an diesen Bildungen nicht beteiligten Protoplasamassen ließ keine Besonderheiten erkennen. Die Eigenbewegung der Granula in den Protuberanzen selbst und ihrer unmittelbaren Nähe war von den hier herrschenden Strömungen überlagert und daher nicht erkennbar.

Bei der weiteren Verteilung der in Schichten angeordneten Zelleinschlüsse dürfte die BMB die bedeutendste Rolle spielen.

Die auf die Dottergranula folgende nächst schwerere Schicht der „Sphaerulae“ zeigt eine u. U. wechselnde Ausdehnung. Es handelt sich dabei offenbar um Vakuolen, die bisweilen das ganze Protoplasma durchsetzen können, was wohl als der Ausdruck einer Schädigung aufzufassen ist. Ihre Lagerung kann dabei so dicht werden, daß sich die einzelnen Vakuolenwände berühren, man also von einer Spumoidstruktur sprechen muß. In diesen Sphaerulae sind kleine Körnchen von etwa $0,1\text{--}0,5\ \mu$ Durchmesser zu beobachten, die BMB zeigen. Im unbehandelten, nicht zentrifugierten Präparat heben sich die Sphaerulae nicht besonders deutlich gegen ihre Umgebung ab, so daß sich ihre Begrenzung meist nur aus der hier im Querschnitt kreisförmigen Anordnung der Granula des Protoplasmas ersehen läßt.

Auf die Sphaerulae folgt eine einschluflose Schicht, in der die Vorkerne zu finden sind.

Eine dichte Masse heftig in BMB wimmelter Granula von etwa $0,1$ bis $0,3\ \mu$ Durchmesser stellt die letzte und schwerste Schicht dar. Diese hier so auffällige, schon von den ersten Untersuchern (Hogue 1910) erwähnte BMB ist um so überraschender, als man in der nicht zentrifugierten Zelle auch bei stärkster Vergrößerung davon meist nichts bemerkt.

Mit stärkster Vergrößerung und am besten binokularer Beobachtung sind jedoch auch in der nicht zentrifugierten Zelle, wo die verschiedenen Einschlüsse gleichmäßig durchmischt liegen, solche kleine Granula in BMB zu beobachten. Sie führen dabei ihre Bewegungen in den Lücken zwischen den übrigen Einschlüssen aus, und ihre Bahnen dürften dadurch erheblich beeinflusst sein. Es wird deshalb, und weil es auch nicht einfach ist, an der lebenden Zelle sicher zu entscheiden, ob die BMB im Protoplasma oder in einer Vakuole ausgeführt wird, schwer sein, mit ihr eine Viskositätsbestimmung des Protoplasmas vorzunehmen. Am ehesten wird dies, unter entsprechenden Einschränkungen, an der zentrifugierten Zelle mit einer derartigen Methode (Fürth, Pekarek, Kató) möglich sein.

Die Wirkung des Zentrifugierens auf die Viskosität wird meist als gering

bezeichnet und hat auch, wenn dies nicht in extremer Form geschieht, keinen faßbaren Einfluß auf die Intensität der GB, wie aus den Meßergebnissen auf Seite 50 hervorgeht. In einem Fall jedoch hatte nur kurzes Zentrifugieren mit der oben beschriebenen Ultrazentrifuge eine sehr tiefgreifende Wirkung. Material, das auf irgendeine unbekannte Weise geschädigt war und zunächst keine Besonderheiten erkennen ließ, war nach dem Zentrifugieren nicht geschichtet und das ganze Protoplasma der Eier in der oben beschriebenen Weise als Spumoid ausgebildet. Ob man hier von einem „Emulsionsumschlag“ (Liesegang 1912) als Folge der durch das Zentrifugieren begonnenen Entmischung sprechen kann oder im Sinne v. Möllendorffs (1937) hierin einen Ausdruck des von ihm angenommenen Viskoregulationsvermögens der Zelle gegen die Viskosität verschiebende Einflüsse annehmen will: die Viskosität des Gesamtprotoplasmas hat durch diese Spumoidbildung eine erhebliche Änderung erfahren.

BMB führen ferner, nicht immer deutlich, kleine Einschlüsse des zweiten Richtungskörpers aus.

5. Beobachtungen an gepreßten Eiern

Mechanisches Pressen der Eier hat zunächst, auch wenn die Zelle schon deutlich breiter und abgeflachter ist, keinen merklichen Einfluß auf die GB. Da hierdurch der Zellinhalt in toto mehr in eine Ebene gebracht wird, erhält man sehr scharfe Bilder, die auch die sonst infolge der Kugelgestalt der Eizelle unscharfe Mittelpartie nicht aufweisen. Klar tritt an solchen Aufnahmen die völlige Unregelmäßigkeit der GB im ganzen zu überblickenden Eiraum in Erscheinung. Auch der Eindruck des partiellen Hin- und Herrückens ganzer Eibezirke fehlt hier, der bei nicht gepreßten Zellen bisweilen entstehen kann.

Eine ähnliche Beobachtung wird von Untersuchern der BMB beschrieben, und zwar tritt hier der Eindruck des partiellen Hin- und Herrückens dann in Erscheinung, wenn die Lagerung der Brownschen Teilchen eine gewisse Dichte überschreitet (Pekarek 1932). Es liegt nahe, diesen Eindruck hier wie auch bei der GB als Sinnestäuschung anzusprechen und kein reales partielles Hin- und Herrücken des Protoplasmas anzunehmen. Der Eindruck wird dann entstehen, wenn mehrere Teilchen eines kleinen Bezirks rein zufällig die gleiche oder etwa gleiche Bewegungsrichtung aufweisen. Ferner wird ein gewisses temporäres Aneinanderhaften und ein damit verbundenes mehr oder weniger synchrones Bewegen der Granula ebenfalls einen solchen Eindruck hervorrufen können. Wenn man nur einen sehr kleinen Ausschnitt einer Zelle intensiv beobachtet, läßt sich ein solches Verhalten bisweilen gut verfolgen. Zwei bis dahin völlig unabhängig voneinander tanzende Granula nähern sich z. B. langsam, führen dann ihre Bewegungen dicht nebeneinanderliegend mehr oder weniger synchron aus und trennen sich schließlich wieder und tauchen dann langsam, jedes nach einer anderen Richtung, im Gewimmel der übrigen unter. Diese Darstellung bezieht sich allein auf das Filmlaufbild, und es soll mit ihr nichts über die Ursache der Bewegung ausgesagt sein.

Noch stärkeres Pressen der Eier bis an die Grenze der Haltbarkeit der Schale hat, besonders wenn dies mehrmals hintereinander mit Pausen geschieht, ein Verschwinden der Zellmembran zur Folge, so daß sich der Zellinhalt mit dem etwa gleich großen Inhalt des perivitellinen Raumes mischt. Danach ist also der ganze Schalenraum homogen von diesem Mischungsprodukt ausgefüllt. Diese mechanische Schädigung ist, obwohl die äußere Eischale nicht geplatzt und intakt geblieben ist, als eine irreversible anzusehen, und das Auftreten dieser Symptome dürfte als das Eintreten des Zelltodes aufzufassen sein. Ein ähnlicher Effekt ist außerdem durch sehr starkes und langes Zentrifugieren zu erzielen.

Die Bewegung der Granula dauert während dieser Vorgänge unvermindert an und wird besonders an den randlichen Zonen bald so schnell, daß man sie subjektiv als BMB beobachten kann. Hier treten die Granula zuerst in die perivitelline Flüssigkeit über, und aus der Tatsache, daß sie hier sofort eine deutliche BMB erkennen lassen, ist auf eine verhältnismäßig niedrige Viskosität der perivitellinen Flüssigkeit zu schließen. Je weiter dann die Vermischung von Protoplasma und perivitelliner Flüssigkeit neben anderen Veränderungen fortschreitet, um so größer wird die Zahl der Granula, die eine BMB ausführen.

Anders verhalten sich die Granula in einem Ei, das mit der im vorstehenden beschriebenen „Preßtauchkappe“ mit einem Ruck bis zum Platzen seiner Schale zusammengedrückt wird. Der Eiinhalt tritt dabei je nach der Heftigkeit des ausgeübten Druckes ganz oder teilweise aus dem klaffenden Riß der Eischale aus. Beobachtet man diesen Vorgang unter Zeitraffung, so sieht man, besonders wenn nur sehr wenig Protoplasma aus dem Riß in das umgebende Medium, hier Wasser, ausgetreten ist, schlagartig jede Bewegung in dem im Schaleninneren verbliebenen Protoplasmarest aufhören.

Diese Erscheinung des ruckartigen Aufhörens der GB im gesamten Protoplasma bei u. U. nur auf einen sehr kleinen Protoplasma-Bezirk einwirkendem mechanischem Insult (Anstechen mit einer spitzen Nadel etc.) ist schon früher von Kuhl besonders an Nematoden-Eiern der Gattung *Rhabditis* beobachtet worden und als Ausdruck einer plötzlichen Protoplasma-Koagulation aufzufassen. In anderen Fällen dagegen, z. B. bei Amöben, tritt nach Eingriffen mit Mikronadeln eine Verflüssigung des Protoplasmas ein (Chambers 1922), was auch für einige pflanzliche Protoplasten zu gelten scheint (Katô 1933).

6. Beobachtungen an Eiern bei verschiedenen Temperaturen

Ein verhältnismäßig schnelles Aufhören der GB war noch besser bei Versuchen zu beobachten, bei denen die Temperatur kontinuierlich bis auf etwa 80°C erhöht wurde. Dabei nimmt die Bewegungsintensität nicht einwandfrei erkennbar bis zu einem Maximum zu, um dann ziemlich plötzlich gänzlich aufzuhören. Derart erhitzte Eier verändern ihr morphologisches Aussehen so wenig, daß sie wiederholt noch längere Zeit aufgenommen wurden in der Annahme, sie seien noch nicht irreversibel geschädigt. Das geraffte Filmlaufbild ließ dann erkennen, wie der Zelltod, mit dem das

plötzliche Aufhören der GB nach älterer Auffassung gleichgesetzt wird, schon viel früher eingetreten war.

Das Absterben durch Temperaturerhöhung wurde auch an zentrifugierten Eiern untersucht, um das Verhalten der verschiedenen Zelleinschlüsse, hier in Schichten geordnet, besser beobachten zu können. Die zentrifugierten Eier kamen dazu auf den vorher abgekühlten Temperiertisch, der, nachdem die Eier etwa $\frac{1}{2}$ Stunde bei 20° aufgenommen worden waren, plötzlich mit 90° heißem Wasser durchströmt wurde. Eine langsame Temperaturerhöhung verbietet sich hier, weil durch die Auflösung der einzelnen Schichten bis zum Eintritt des Zelltodes sonst der Zweck des Versuches nicht erreicht werden könnte.

Die GB der Dottergranula sowie die BMB der kleinen Granula des zentrifugalen Poles hören bei plötzlicher Temperaturerhöhung gleichzeitig auf. Die Grenze gerade dieser letztgenannten Schicht hebt sich deutlich gegen die nächst leichtere Schicht ab, und die ganze Schichtung wird durch die Koagulation des Protoplasmas fixiert.

7. Beobachtungen an Eiern unter Luftabschluß

Eier, die sich in einem ganzseitig mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparat befinden, teilen sich nicht und beharren unverändert auf dem jeweiligen Entwicklungsstadium. Unter Zeitraffung (80fache Raffung) zeigten die Granula solcher Eier eine sehr stark herabgesetzte Bewegungsintensität. Öffnet man ein solches Präparat und setzt frisches, sauerstoffhaltiges Wasser hinzu, so erreicht die Bewegungsintensität der Granula schon nach 1 bis 2 Stunden ihr gewohntes Maß.

8. Beobachtungen an Eiern während der Vorkernvereinigung bis zur ersten Teilung

Schwankungen der Intensität der GB während der Vorkernvereinigung und nachfolgenden ersten Teilung ließen sich an Hand des gerafften Filmlaufbildes nicht nachweisen. Solche Änderungen der Bewegungsintensität im normalen Entwicklungsgeschehen sind jedoch für andere Formen, wie bereits eingangs erwähnt, von Kuhl (1941 c) beschrieben. Eine solche kurze Intensitätszunahme kurz vor einer Teilung, wie sie im Ei von *Pomatoceros triqueter* besonders gut zu beobachten ist, kann möglicherweise auch im Ei von *Parascaris* vorkommen. Nimmt man an, daß sich die Granula nur während einer Zeit von 5 Minuten merklich schneller bewegen, so würde dieser Vorgang bei 80facher Geschwindigkeit in der 80fach kürzeren Zeit von 4 Sekunden ablaufen. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß er wie andere, nur kurz dauernde Vorgänge bei der Betrachtung des Filmlaufbildes einfach der Beobachtung entgeht.

9. Bemerkungen zur Geschwindigkeitsbestimmung geraffter Bewegungsvorgänge

Im allgemeinen besitzen die auf einfache Betrachtung des Filmlaufbildes gestützten Geschwindigkeitsangaben von Bewegungsabläufen nur be-

schränkten Wert. So trat z. B. in Versuchen, bei denen die Temperatur des Präparates während eines Zeitraumes von 1–2 Stunden laufend bis zum Tod der Zelle erhöht wurde, eine Zunahme der Bewegungsgeschwindigkeit der Granula nicht augenfällig in Erscheinung. Ein weiterer Versuch bestätigte dann die Unzuverlässigkeit derart subjektiv gewonnener Angaben.

Es wurde dazu ein abgestorbenes Ei, dessen Granula subjektiv erkennbar BMB ausführten, mit der hier stets angewandten 80fachen Geschwindigkeit aufgenommen. Diese geraffte BMB unterschied sich dabei so wenig von der erst durch die Zeitraffung zutage tretenden GB, daß ein unbefangener Beobachter bei einer ersten Vorführung kaum einen Unterschied wahrnehmen dürfte. Die Bahnen der Granula sind hier etwas eckiger, aber keinesfalls ist aus dem Vergleich der beschleunigten GB und BMB auf deren tatsächliche Geschwindigkeitsunterschiede zu schließen.

Auf die Bedeutung der hier häufig angestellten Vergleiche und Parallelen zwischen GB und BMB soll erst weiter unten eingegangen werden.

Im besonderen gilt für vergleichende Geschwindigkeitsangaben, daß Änderungen eines Bewegungsvorganges nur dann zuverlässig wahrgenommen werden, wenn dieser dabei mindestens einmal mit einer für unser Bewegungssehen optimalen oder wenigstens günstigen Geschwindigkeit abläuft. Man könnte hier in Analogie zu dem in der Optik verwendeten Begriff des „förderlichen Abbildungsmaßstabes“ auch von einer „förderlichen Geschwindigkeit“ sprechen, worunter dann die Geschwindigkeit eines Bewegungsvorganges zu verstehen wäre, die die geringste Änderung ihrer selbst noch wahrnehmen läßt, oder, anders ausgedrückt, bei der das menschliche Bewegungssehen die größte Unterschiedsempfindlichkeit besitzt.

Für die Praxis, z. B. die Untersuchung der GB, würde dies bedeuten, daß man den zu prüfenden Vorgang zunächst von normaler Geschwindigkeit bis zur stärksten praktisch erforderlichen Raffung aufnehmen müßte, am besten bei kontinuierlich zunehmender Geschwindigkeit. Das Laufbild ließe dann zunächst gar keine Bewegung erkennen, die sich dann über eine eben wahrnehmbare Stufe bis zu einem nicht mehr verfolgbaren Gewimmel steigern würde. Die dazwischen liegende, für die Beobachtung günstige Geschwindigkeit liefert dann, so getestet, die für die weitere Untersuchung maßgebende Raffung.

Dieser Versuch setzt die Möglichkeit der kontinuierlichen Steigerung oder Senkung der Aufnahme Frequenz voraus, was technisch einige Schwierigkeiten bereitet und deshalb praktisch im vorliegenden Falle noch nicht durchgeführt wurde.

Ferner ist noch zu erwähnen, daß selbstverständlich streng genommen bei der Beschreibung derartiger Versuchsbedingungen die Angabe der optimalen Raffung allein nicht genügt, um den Versuch einwandfrei reproduzieren zu können. Gerade im mikroskopischen Bereich ist es unbedingt nötig, den benutzten Abbildungsmaßstab (bezogen auf das vorgeführte Laufbild an der Leinwand) mit anzugeben. Mit dem Abbildungsmaßstab ändert sich ja auch scheinbar die Geschwindigkeit eines Vorganges. Am Beispiel der GB würde dies heißen, daß bei verschiedenen Abbildungsmaßstäben trotz gleichbleibender Raffung von einem Granulum verschieden

lange Wege in gleichen Zeitabständen auf der Leinwand zurückgelegt werden.

Soweit die Beschreibung der Versuche und ihrer Ergebnisse, soweit sich diese aus der subjektiven Betrachtung des gerauschten Filmlaufbildes entnehmen lassen.

10. Ergänzende Darstellung weiterer cyto-dynamischer Vorgänge

Aus der vorhergehenden Darstellung der GB geht noch nicht mit der nötigen Klarheit hervor, welche anderen dynamischen Vorgänge der Zelle außerdem zu beachten sind und wie sich die GB von diesen unterscheidet. Diese Bewegungsvorgänge sind zum Teil auf prinzipiell verschiedene Ursachen zurückzuführen und laufen außerdem mit sehr verschiedenen, meist der subjektiven Betrachtung nicht unmittelbar zugängigen Geschwindigkeiten ab. Die wichtigsten seien deshalb kurz zusammengestellt, weil das Wesen der GB dadurch noch deutlicher hervortritt.

1. So ist als erstes bei subjektiver, am besten binokularer Beobachtung mit starker, mindestens 1000facher Vergrößerung ein sehr schnelles Hin- und Herrücken der Eizelle im perivitellinen Raum zu beobachten. Es erfolgt so schnell und die Drehungen sind von so geringem Ausmaß, daß man versucht ist, es als ein Vibrieren zu bezeichnen. Diese Bewegung wurde zunächst übersehen, tritt jedoch im gerauschten Filmlaufbild verstärkt und schon bei mittlerer 500facher Vergrößerung erkennbar deutlich in Erscheinung. Sie dürfte durch die Stöße der in Wärmebewegung befindlichen Moleküle der perivitellinen Flüssigkeit verursacht, also BMB sein. Andere Faktoren, wie z. B. lokale Änderung der Oberflächenspannung, kommen als Ursache für solche Drehungen ebenfalls in Frage. Diese Drehungen können um jede beliebige Achse stattfinden, fehlen vermutlich auch bei anderen, ähnlich gebauten Eiern nicht und haben die exakte Messung der GB außerordentlich erschwert.

2. Bewegungen der Vorkerne, Spindel, Kernmembran, Synkaryon, Nukleolen etc., deren Ursachen weitgehend unbekannt sind. Sie sind nur durch die Zeitraffung darzustellen, und es ist verständlich, daß sie die Granula passiv verlagern können.

3. In dieser Wirkung sehr ausgeprägt sind solche Strömungen des Protoplasmas, die auf lokale Änderung der Oberflächenspannung etc. zurückzuführen sind und die stärksten Verlagerungen der Granula verursachen können. Als Beispiel möge der oben beschriebene Fall eines sehr stark zentrifugierten Eies mit anschließender Protuberanzenbildung gelten.

4. Im Anschluß hieran sind die durch den Vorgang der Furchung hervorgerufenen Bewegungen zu nennen, die außerdem ganze Drehungen des Keimes zur Folge haben können (z. B. *Psammechinus miliaris*. Kuhl 1949 a).

5. Die „Massenausgleichsbewegung“ (Kuhl 1949 a), die während einer Teilung als ein Hin- und Herfließen des Protoplasmas in der letzten Verbindungsbrücke vor dem gänzlichen Durchschneiden einer Teilungsfurche

in Erscheinung tritt. Sie ist erstmalig für das Seeigel-Ei beschrieben und ließ sich am *Parascaris*-Ei nicht nachweisen.

6. Die verschiedensten Eibewegungen und Kontraktionserscheinungen bei Teleostier-Eiern, den Eiern von Ascidien (Vandebroek 1937), amöboide Beweglichkeit des Eies oder der Richtungskörper (z. B. bei der Maus. Kuhl 1941 a) und viele andere Bewegungstypen mehr.

7. BMB von Zelleinschlüssen.

8. Die nur unter Zeitraffung sichtbare GB.

Diese Aufzählung mag genügen, da in dem hier vorliegenden Falle nur ein bestimmter Eizellentyp Gegenstand der Untersuchung ist. Sie ließe sich selbstverständlich, besonders wenn nicht nur Eizellen Berücksichtigung fänden, noch erheblich erweitern.

Es erhellt aber aus dieser Darlegung, daß die Granula durch eine Vielzahl ursächlich verschiedener Bewegungsvorgänge verlagert werden können oder umgekehrt als Indikatoren für die verschiedensten Bewegungsvorgänge in Anspruch zu nehmen sind. Keinesfalls genügt, besonders bei den langsamen, für unser Zeitmoment nicht wahrnehmbaren Verlagerungen, der Weg oder die Geschwindigkeit nur eines oder weniger Granula, um daraus kurzerhand auf irgendeinen dieser Bewegungstypen sicher schließen zu können.

IV. Messung der Bewegungsgeschwindigkeit der Granula

Wichtigstes Ziel der näheren Untersuchung einer bis dahin nur oberflächlich bekannten und kurz beschriebenen Erscheinung in der Biologie dürfte es sein, zunächst eine Methode zu ermitteln, die den Vorgang irgendwie vergleichbar messend zu erfassen gestattet, und ferner die Angabe irgendeines physikalischen Grundvorganges, der als seine Ursache wahrscheinlich gemacht werden kann. Es wurde deshalb erstens ein exaktes Maß für die Intensität der GB und zweitens eine physikalische Erscheinung als die Ursache der GB zu ermitteln versucht.

Zur Ermittlung der mittleren Geschwindigkeit der Granula als einem Maß für ihre Bewegungsintensität war es nötig, den von einer Anzahl Granula in einer bestimmten Zeiteinheit zurückgelegten Weg messen zu können.

Dies wurde zunächst, da subjektive Methoden, wie bereits geschildert, versagen, nach der Filmaufnahme mit dem Film-Auswertapparat versucht. Das Filmbild wird hierzu am besten im durchfallenden Licht auf Transparentpapier projiziert und die Kontur des zu beobachtenden Gegenstandes auf dem Papier mit Bleistift umfahren. Alsdann wird das nächste, um einen bestimmten Zeitbetrag später aufgenommene Filmbild auf das gleiche Papier projiziert, wiederum die Kontur vermerkt und so fort (Verfahren der Teilbildanalyse, Kuhl 1949 b). Im günstigen Fall liegen die Konturen dann wie die Perlen einer Kette hintereinander und ergeben so den Wanderweg einer Zelle, eines Kernes oder eines anderen sich bewegenden Körpers. Diese Methode ließ sich zur Ermittlung des Granulaweges leider nicht verwenden.

Selbst die beste, sorgfältig ausgewählte mikroskopische Optik liefert

keine so scharfen Bilder der Granula, wie sie für eine derartige Auswerttechnik unbedingt nötig sind. Die Granula erscheinen lediglich als helle und dunkle Flecke und machen es bei normal dichter Lagerung kaum möglich, in diesem Mosaik von Hell und Dunkel ein Granulum abzugrenzen, geschweige denn es auf dem nächsten Bild wiederzuerkennen.

Man kann sich ja hier nicht, wie bei subjektiver Beobachtung im Mikroskop, durch Fokussieren ein räumliches Bild zu verschaffen suchen, sondern hat als Teilbild nur eine einzige Ebene scharf abgebildet zur Verfügung. Keinesfalls genügt die Schärfe der Bilder, um alle Granula, die in einer Ebene des Bildfeldes liegen, als solche zu identifizieren und eventuell zu verfolgen. Das Laufbild läßt dies zunächst viel leichter erscheinen, weil durch die Bewegung eine gewisse Räumlichkeit des Bildes gegeben ist, die die Verfolgung eines Granulums im Laufbild sogar über längere Zeiträume spielend gestattet.

Erst nachdem einzelne, aufeinanderfolgende Bilder des Films durch Projektion auf Papier zum Format 15×18 cm vergrößert wurden und nunmehr mehrere Bilder aus einer Minute Beobachtungsdauer nebeneinander zum leichten Vergleich vorlagen, gelang es, etwa 10 Granula ohne sonderliche Mühe auch während einer Zeitdauer von zwei oder drei Minuten (bezogen auf die tatsächliche Bewegungsdauer) zu verfolgen.

Die beobachteten Granula sowie drei charakteristische Unebenheiten der festliegenden Eischale als Bezugspunkte wurden darauf durch einen feinen Nadelstich durch ihr Zentrum in das Papier gekennzeichnet. Auf eine von unten beleuchtete Mattscheibe gelegt, ließen sich so die hell durchscheinenden Markierungspunkte von einem Phasenbild auf darübergelegtes Transparentpapier übertragen. Die richtige Orientierung war insofern gewährleistet, als lediglich die Bezugspunkte der Eischale zur Deckung gebracht werden mußten. Verbindet man schließlich auf dem Transparentpapier die Lagepunkte eines Granulums nach jeweils gleichen aufeinanderfolgenden Zeitabständen, so ist das Ergebnis ein unregelmäßig zickzackförmiger Weg, ähnlich demjenigen, den man bei ähnlichen Versuchen bei der Bestimmung des Weges eines Brownschen Teilchens erhält.

Allerdings läßt sich diese Methode nur anwenden, wenn die Eizelle in der perivitellinen Flüssigkeit ruhig liegt und gegenüber der Eischale keinerlei Verschiebungen aufweist. Andernfalls erhält man den Eigenweg eines Granulums plus seinem durch die Eibewegung verursachten Verschiebungsweg gegenüber den Bezugspunkten der Schale.

Wie das Laufbild eindeutig zeigt, führt aber jedes normale in der perivitellinen Flüssigkeit schwebende Ei solche Drehbewegungen (vgl. S. 39) aus, wodurch diese Methode also für das gänzlich unbeeinflusste Ei nicht angewandt werden kann.

Nur an einem stark gepreßten Ei wurde von dieser Methode Gebrauch gemacht, da hier die Eizelle erheblich abgeflacht völlig ruhig lag, wie sich an Hand des Laufbildes kontrollieren ließ. Die gleichzeitig durch das Pressen mehr in eine Ebene gebrachte Verteilung der Granula lieferte außerdem besonders scharfe Aufnahmen. Die Lagepunkte von 50 Granula ließen sich so von Minute zu Minute an Hand von Papiervergrößerungen 4 Minuten

lang markieren, woraus sich eine „mittlere horizontale Verschiebung“ (Einstein 1922, Smoluchowski 1923, zit. nach Pekarek 1930) der Granula von etwa $0,5 \mu$, also etwa um die Hälfte ihres Durchmessers, pro Minute bestimmen ließ.

Gleichzeitig ließ sich, nachdem die je fünf Lagepunkte eines Granulums durch gerade Linien verbunden waren, dieser Darstellung entnehmen, daß nahe beieinanderliegende Granula eine gleiche Bewegungsrichtung bevorzugen, mit anderen Worten Anziehungskräfte zwischen solchen Granula wirksam zu sein scheinen. Die sorgfältige Beobachtung des Laufbildes bestätigte diesen Befund. Solchen nahe beieinander liegenden Granula, die während des Zusammenliegens eine mehr oder weniger gemeinsame Bewegungsweise aufweisen, stehen völlig isolierte, sich allein bewegende Granula gegenüber.

Es bestand nun die Möglichkeit, von der „mittleren horizontalen Verschiebung“ der Granula als einem Maß für ihre Bewegungsintensität weiterhin Gebrauch zu machen. Zu jeder Messung müßte dann die Ruhelage der Eizelle im perivitellinen Raum durch ein kräftiges Pressen des Eies erzwungen werden.

Diese Methode wurde jedoch nicht benutzt. Das Pressen stellt nämlich neben der komplizierteren Arbeitstechnik einen Eingriff dar, der, besonders wenn zu wiederholten Messungen auch mehrmals ausgeübt, die Zelle auf die Dauer schädigen dürfte. Aus diesem Grund sind an einem sich normal entwickelnden Ei mehrere Messungen kaum möglich, abgesehen von empfindlichen Eiern oder Zellen, bei denen die Methode überhaupt nicht anwendbar ist. Besonders eine vergleichende Betrachtung der GB an verschiedenen Objekten würde durch alle diese Einschränkungen nicht unerheblich erschwert. Am ehesten ließe sich mit der angegebenen Methode noch an Eiern arbeiten, die auf Grund ihres nicht kugeligen Baues keines künstlichen Ruhiglegens durch Pressen bedürfen.

Aus diesen Gründen wurde eine andere Meßmethode versucht, die trotz bestehender Drehbewegungen des Eies ein brauchbares Maß für die Intensität der GB zu ermitteln gestattet. Dieses Maß wird im folgenden als „Relatives Verschiebungsmittel“ (RVM) bezeichnet und gibt an, um welchen Betrag die Granula in einer Zeiteinheit im Mittel ihre Lage zueinander, auf eine Ebene projiziert, ändern.

Zu seiner Ermittlung wird lediglich die Anfangslage einer möglichst großen Anzahl von Granula, also zur Zeit 0, benötigt, und ferner ihre Endlage nach der Zeit 1. Man mißt nun, um welchen Betrag sich der Abstand zwischen dem Granulum 1 und dem Granulum 2 in der Zeit 1 geändert hat, ohne dabei darauf Rücksicht zu nehmen, ob sich dieser Abstand verringert oder vergrößert hat. In gleicher Weise mißt man dann die Abstandsänderungen zwischen Granulum 1 und 3, 1 und 4, ... 1 und n ; in einer zweiten Reihe die Abstandsänderungen zwischen Granulum 2 und 3, 2 und 4, ... 2 und n ; in einer dritten Reihe zwischen Granulum 3 und 4, 3 und 5, ... 3 und n usw. Mittelt man die Ergebnisse, so erhält man das RVM in der der Messung zugrunde gelegten Zeiteinheit, das, wie leicht einzusehen ist, wachsen muß, wenn die Bewegungsgeschwindigkeit der GB zunimmt. Es wächst ebenfalls

mit der Zeit, jedoch in keinem ihr direkt proportionalen Verhältnis, was bei dem Vergleich der Meßergebnisse mit den Ergebnissen anderer Autoren zu berücksichtigen ist.

Der Vorteil des RVM ist nun, daß damit in einfacher Weise die die Eigenbewegung der Granula überlagernden Drehbewegungen und Verschiebungen der Eizelle im perivitellinen Raum mehr oder weniger ausgeschaltet werden. Die Verlagerungen der Granula gegenüber einer Bezugsgeraden durch die störenden Eibewegungen dürfen dabei nicht wesentlich größer sein als ihre durch die „Eigenbewegung“ hervorgerufenen Verlagerungen. An den meisten Eizellen dürfte dieses Erfordernis weitgehend erfüllt sein.

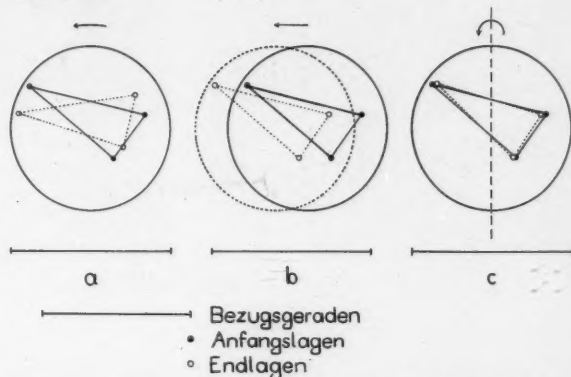


Abb. 7. Schema zur Erläuterung der Ausschaltung von Drehbewegungen des Eies um verschiedene Achsen durch Anwendung des „Relativen Verschiebungsmittels“ bei der Intensitätsbemessung der Granulabewegung.

Zu 100% ausgeschaltet werden dabei Drehbewegungen der Eizelle, die um eine mit der optischen Achse zusammenfallende Drehachse erfolgen (Abb. 7 a). Dieser Fall dürfte praktisch der häufigste sein. Nicht symmetrische Verteilung der Protoplasmaeinschlüsse von verschiedenen spezifischen Gewichten, Linsenform der Eizelle, leichter Druck durch das Deckglas, so daß die Eizelle oben oder unten mit der Eischale in Berührung kommt etc., lassen eine Drehung um eine derartige Achse bevorzugt auftreten.

Ebenfalls vollkommen ausgeglichen werden reine Verschiebungen in der Horizontalen nach jeder Seite (Abb. 7 b). Liegt dagegen die Drehachse senkrecht zur optischen Achse (Abb. 7 c), so ist die Ausschaltung keine vollständige, was auch für den Fall gilt, daß beide einen Winkel von weniger als 90° bilden. Durch eine hinreichend große Anzahl von Einzelergebnissen dürften die hieraus resultierenden Ungenauigkeiten des RVM genügend ausgeglichen werden.

Zur praktischen Durchführung einer solchen Messung ist das geraffte Filmlaufbild, d. h. die Verfügbarkeit und Benutzung einer Filmkamera nicht unbedingt nötig. Allerdings wird man besonders bei experimentellen Arbeiten eine derartige messende Beobachtung erst beginnen können, wenn man mit Hilfe des gerafften Filmlaufbildes

einen Einblick in die hier vorliegenden dynamischen Vorgänge in ihrer Gesamtheit gewonnen hat.

Ist man sicher, daß andere störende, die Messung unmöglich machende Bewegungsvorgänge nicht vorliegen, so genügt es, mit einem Photoapparat

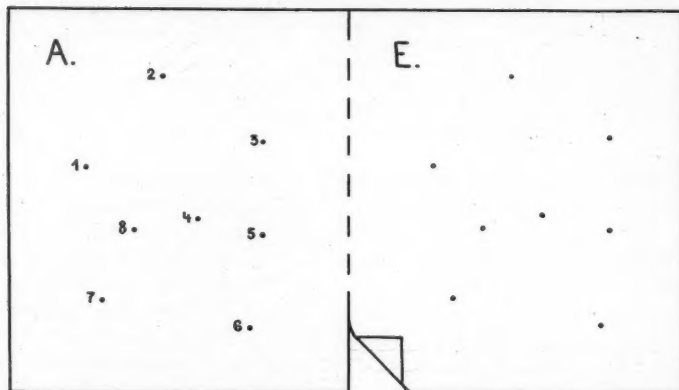
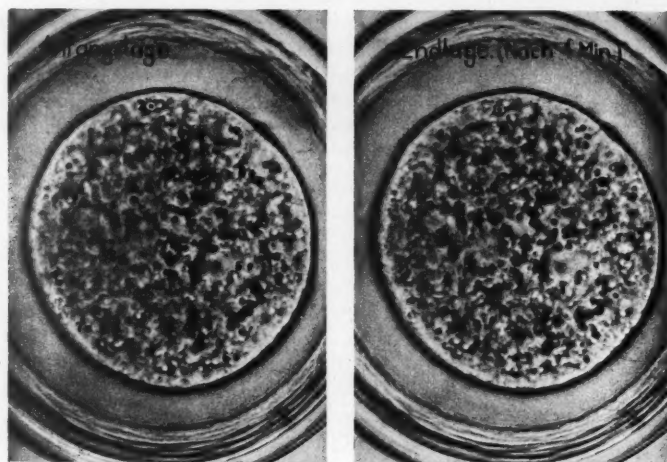


Abb. 8. Zur Erläuterung des Auswertverfahrens durch Nebeneinander-Projizieren von Anfangs- und Endlage auf Papier. Oben die nebeneinander projizierten Anfangs- und Endlagen. Acht Granula werden auf beiden durch einen Bleistiftpunkt markiert. Darunter nebeneinander auf einem Papierstreifen die jeweiligen acht Lagepunkte von Anfangs- (A) und Endlage (E). Zur weiteren Vermessung werden A und E getrennt übereinander gelegt.

Einzeltaufnahmen in geeigneten Zeitabständen zu machen. Im vorliegenden Fall am *Parascaris*-Ei geschah dies in $\frac{1}{4}$ oder 1 Minute Abstand, in der die

für eine Einzelmessung erforderlichen zwei Aufnahmen, also Anfangs- und Endlage, belichtet wurden.

Schon als entwickeltes Negativ lassen sich diese beiden Aufnahmen durch einen geeigneten Vergrößerungsapparat nebeneinander auf einen Papierstreifen projizieren. Je stärker man dabei die Bilder vergrößern kann, um so besser ist es, und das Format 15×18 cm für ein Einzelbild wird dabei als ein Minimum der Vergrößerung anzusehen sein. Man hat auf diese Weise also im verdunkelten Raum die vergrößerten Negative von Anfangs- und Endlage nebeneinander bequem zu überschauen vor sich, und es gelingt nun, wenn der Zeitabstand zwischen beiden nicht zu groß ist, die Lagepunkte von einigen Granula auf der Anfangs- und Endlage durch einen feinen Bleistiftpunkt auf dem Papier zu markieren. Dabei muß man natürlich sicher sein,

daß man beispielsweise das Granulum Nr. 1 auf der Anfangslage auch auf der Endlage trotz seiner inzwischen erfolgten, wenn auch geringfügigen Verschiebung richtig wiedererkennt (Abb. 8). Besonders wenn man sich erst etwas eingesehen hat, gelingt dies meist ohne große Mühe. Es besteht dabei die Gefahr, daß man gewohnheitsmäßig die Granula bevorzugt und ausliest, die sich am leichtesten auf der Endlage wiederfinden lassen, die mit anderen Worten die geringste Verlagerungserfahrung haben. Durch rein zufällsmäßige Auswahl der Granula ließ sich diese Fehlerquelle nicht völlig ausschalten, weil man aus optisch bedingten

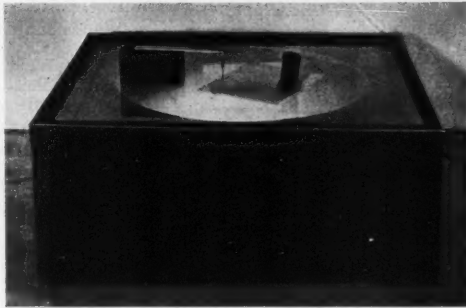


Abb. 9. Anfangs- und Endlage auf eine von unten beleuchtete Mattscheibe übereinander gelegt. Das Papier mit den Markierungspunkten der Endlage liegt unten. Auf diese Weise schimmern die Markierungspunkte der Endlage durch die Anfangslage hindurch. Links ein Bleigewicht mit einem Messingbügel, der an seinem Ende eine senkrechte Nadel trägt. Mit dieser Nadel lassen sich die Lagepunkte eines Granulums auf Anfangs- und darunter liegender Endlage leicht fixieren und so bequemer die Abstandsänderungen dieses Granulums von allen übrigen mit Hilfe einer Meßlupe (rechts) bestimmen.

Gründen keine restlos scharfen Bilder erhalten kann und sich oft auf der Anfangslage deutlich abgegrenzte Granula auf der Endlage nicht mehr identifizieren lassen. Es wird dies erst dann gelingen, wenn man von allen Granula einer Ebene ein restlos scharfes Bild zur Verfügung hat.

Auf diese Weise erhält man also auf einem Papierstreifen links die Anfangslagen von beispielsweise acht Granula markiert und rechts ihre Endlagen (Abb 8 unten). Darauf schneidet man den Papierstreifen mitten durch und legt Anfangs- und Endlage übereinander auf eine von unten beleuchtete Mattglasscheibe. Bringt man nun die Lagepunkte des Granulums 1 auf der Anfangs- und Endlage zur Deckung und sticht, am besten mit einer Nadel,

hindurch (Abb. 9), so lassen sich leicht mit Hilfe einer Meßlupe die Abstandsänderungen dieses Granulums 1 von Granulum 2, 3, 4, ... 8 bestimmen (hierzu Abb. 10 und 11). In gleicher Weise bestimmt man dann die Abstandsänderungen

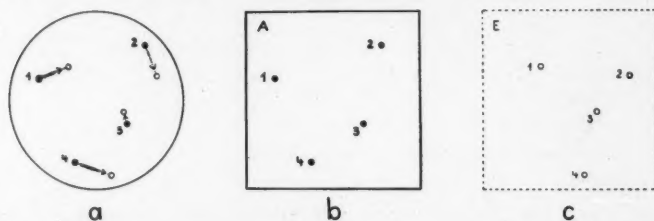


Abb. 10. Beispiel zur Veranschaulichung des Ausmessens. Zur Erleichterung der Übersichtlichkeit werden nur vier Granula beobachtet. Unter a sind die Anfangslagepunkte (schwarze Kreise) der vier Granula sowie deren Endlagepunkte (helle Kreise) nach einem bestimmten Zeitabstand eingetragen. b: das Papier mit den Anfangslagepunkten der vier Granula, im Text kurz als „Anfangslage“ bezeichnet. c: die „Endlage“ mit den vier Endlagepunkten der Granula.

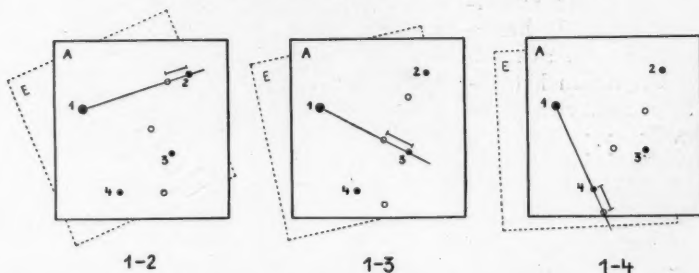


Abb. 11. Anfangs- und Endlage der Abb. 10 sind schematisch übereinander liegend auf dem Leuchtkasten gezeichnet. Ausgezogen die oben liegende Anfangslage, gestrichelt die darunter liegende Endlage. Der Beginn des Vermessens, die Messung der Abstandsänderungen des Granulums 1 von Granulum 2, 3 und 4, sind als Beispiele ausgeführt.

gen des Granulums 2 von den restlichen anderen, dann diejenigen des Granulums 3, 4, ... 7. Im ganzen erhält man so 28 Einzelmaße, die gemittelt und an Hand des mitphotographierten Objektmikrometers auf den richtigen Maßstab gebracht, das RVM ergeben. Für das *Parascaris*-Ei liegt es je nach Bedingung pro Minute zwischen 0,1 und 0,6 μ . Bezüglich der zu erreichenden Genauigkeit ist zu erwähnen, daß man schon bei der Auswertung eines Eies, dessen Inhalt bei 80facher Geschwindigkeit keinerlei Bewegung erkennen läßt, einen Betrag von etwa 0,15 μ erhalten kann, der auf die unvermeidliche Ungenauigkeit der Markierung der Granula, Meßungenauigkeiten etc. zurückzuführen ist. Die Streuung der Werte nimmt außerdem bei konstantem Zeitabstand und Erhöhung der Bewegungsintensität zu. Beträgt sie z. B. bei 1 Minute Abstand bei gegebenen Bedingungen $\pm 15 \mu$, so

hat man dadurch die Möglichkeit, durch Verringern des Zeitabstandes auf beispielsweise $\frac{1}{2}$ Minute die Streuung der Werte auf etwa $\pm 0,5 \mu$ zu verringern.

V. Meßergebnisse

1. Relatives Verschiebungsmittel und Temperatur

Die Brauchbarkeit der angewandten Meßmethode soll nun an einigen Beispielen dargestellt werden. Als erstes dabei die Abhängigkeit der Intensität der GB von der Temperatur.

Vor Aufnahmebeginn wurden die Eier zu diesem Zweck nach Entnahme aus dem Kühlschrank bereits eine Stunde der endgültigen Beobachtungstemperatur ausgesetzt. Von je zehn Eiern aus den für jede Temperaturstufe von 10° zu 10° besonders angesetzten Präparaten wurde dann das RVM bestimmt und die so erhaltenen zehn Werte gemittelt. Dies bedeutet, daß zur Bestimmung des RVM einer einzigen Temperaturstufe im ganzen 280 Einzelmessungen mit der Meßlupe nötig waren.

Das Ergebnis dieses Versuches, der im ganzen dreimal mit geringen Abwandlungen wiederholt wurde, ist in Abb. 12 dargestellt. Obwohl unmittelbar nach dem Maximum der Bewegungsintensität keine Bewegung der Granula mehr nachzuweisen ist („Wärmestarre“), sind solche Eier doch nicht irreversibel geschädigt und können sich anschließend, bei einer niederen Temperatur aufbewahrt, weiter entwickeln.

Die Kurve kann insofern Ungenauigkeiten enthalten, als entsprechend der schnelleren Entwicklung bei erhöhter Temperatur die Eier auf verschiedenen Kernphasen zur Vermessung kamen und dadurch gegebenenfalls damit verknüpfte Schwankungen der Intensität der GB in die Ergebnisse mit Eingang gefunden haben.

Deshalb wurde dieser Versuch auch einmal insofern abgeändert durchgeführt, als die Zeiten zur Temperaturanpassung vor Aufnahmebeginn nicht gleich, sondern untereinander in dem gleichen Verhältnis verschieden waren wie die den einzelnen Temperaturstufen entsprechenden Entwicklungsgeschwindigkeiten. Dadurch sollte erreicht werden, daß die Eier trotz verschiedener Beobachtungstemperaturen auf der etwa gleichen Entwicklungsstufe vermessen wurden. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 13 dargestellt. Die Mittelwerte dieser je zehn Einzelergebnisse auf jeder Temperaturstufe sind in der vorher gegebenen Temperatur-Abhängigkeitskurve des RVM mit enthalten.

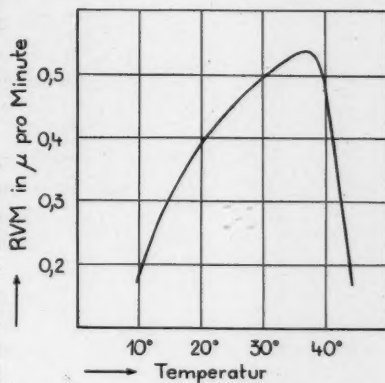


Abb. 12. Abhängigkeitskurve des Relativen Verschiebungsmittels im *Parascaris*-Ei (Vorkernstadium) von der Temperatur.

Schließlich sind noch die durch die angewandte Methode nicht restlos eliminierten, durch Drehbewegungen des Eies hervorgerufenen Verschiebungswege der Granula als Ursache von Meßungenauigkeiten zu nennen. Als BMB ist die Intensität dieser Drehbewegungen ebenfalls temperaturabhängig und deshalb die durch sie hervorgerufenen Ungenauigkeiten von wechselnder, schwer faßbarer Größe. Im ganzen dürften die hierdurch hervorgerufenen Meßfehler als unbedeutend zu vernachlässigen sein.

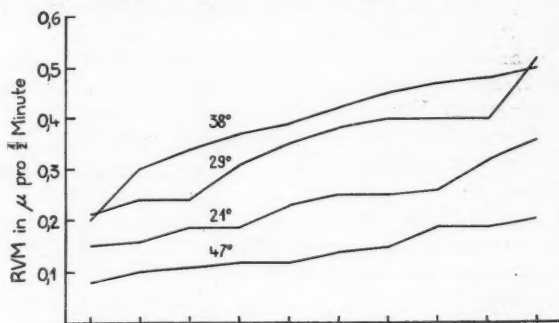


Abb. 13. Ergebnis eines Temperaturversuches. Die zehn Meßergebnisse von je zehn auf jeder Temperaturstufe (21, 29, 38 und 47°) vermessenen Eiern sind von links nach rechts nach ihrer zunehmenden Größe geordnet aufgetragen.

2. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) während Karyogamie und Mitose

Um nun Aufschluß über mögliche Schwankungen der Bewegungsintensität der Granula während der Karyogamie und ersten Teilung zu erhalten, wurde ein und dasselbe Ei, das sich bei konstanter Temperatur entwickelte, alle 30 Minuten bis zur vollendeten ersten Teilung vermessen.

Es fanden zur Auswertung nur solche Granula Verwendung, die von der Peripherie nicht allzu weit entfernt lagen. Im gerafften Filmlaufbild hatten diese Granula während der Vorkernvereinigung und anschließenden Teilung keinerlei Behinderung ihrer Beweglichkeit durch die Polstrahlung etc. erkennen lassen.

Das RVM liegt hier bei etwa $0,4 \mu$ pro Minute. Jede Messung wurde zweimal ausgeführt und die erhaltenen Mittelwerte in der oberen Kurve der Abb. 14 dargestellt. Es läßt sich hieraus lediglich schließen, daß längerwährende mit der Methode leicht faßbare Schwankungen der Bewegungsintensität nicht vorliegen. Für kurzfristige ist die Zahl der Einzelmessungen zu gering.

Auch dieses Ergebnis spricht für den geringen Einfluß möglicher Intensitätsschwankungen während der normalen Entwicklung auf die im vorstehenden gegebene Temperatur-Abhängigkeitskurve der GB.

Schwankungen der Viskosität während der Mitose sind für die Eier verschiedener Tierarten bis ins einzelne beschrieben. Die mit Hilfe der Zentrifugierungsmethode erschlossenen Angaben (z. B. Heilbrunn 1921)

sind dabei oft ohne ausreichende Berücksichtigung der rein mechanisch eine Verlagerung der Einschlüsse hemmenden Wirkung der Strahlungsausbildung gegeben. Obwohl eine solche auch von Fry und Parks (1934) auf Grund eingehender Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnten, fällt es doch schwer, besonders wenn man an das geraffte Filmlaufbild einer sich teilenden Eizelle denkt, der Strahlung eine derartige Wirkung gänzlich abzusprechen.

Ferner sind die oben angeführten Meßergebnisse nicht als ein Maß der GB im Protoplasma schlechthin aufzufassen. Sie haben lediglich für die periphere Protoplasmazone Gültigkeit, und der hier aus verschiedenen Beobach-

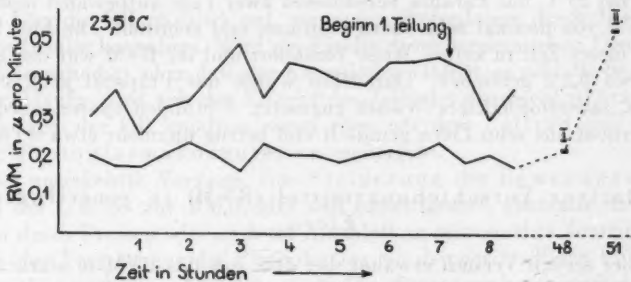


Abb. 14. Obere Kurve: das 8 Stunden lang alle 30 Minuten aus jeweils zwei Messungen ermittelte RVM eines Eies, das sich nach etwas mehr als 7 Stunden teilte. Untere Kurve: das auf die gleiche Weise gewonnene RVM eines Eies, das in einem ganzseitig mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparat lag und sich deshalb wegen Sauerstoffmangels nicht teilen konnte.

Punkt I: das aus zehn Eiern ermittelte RVM des gleichen Präparates nach 48 Stunden.

Punkt II: 3 Stunden später, nachdem das Präparat geöffnet und frisches Wasser zugesetzt worden war. RVM wiederum aus zehn Eiern gemittelt.

tungen gewonnene Eindruck einer auch während der Mitose persistierenden peripheren Zone geringer Protoplasma-Viskosität steht mit Einzelbeobachtungen anderer Untersucher durchaus im Einklang. Sicherlich bedeutet die Ausbildung und Funktion der Polstrahlung eine Änderung der Viskosität des Gesamtprotoplasten, die Viskosität der intergranulären Substanz („Hyaloplasma“) aber, die meist gemessen und unter der Bezeichnung „Protoplasma-Viskosität“ im Grunde verstanden wird, kann ein durchaus davon abweichendes Verhalten zeigen. Wenn daher Schwankungen der Viskosität während der Mitose in der Intensität der GB keinen meßbaren Ausdruck finden, so braucht dies nicht als eine erhebliche Unempfindlichkeit der angewandten Meßmethode aufzufassen sein, sondern kann umgekehrt auch den Schluß auf nur geringe Viskositäts-Änderungen der intergranulären Substanz zulassen.

Eine eindeutige Entscheidung dieser speziellen Frage nach dem Verhalten der GB während der Mitose ist in diesem Rahmen nicht möglich, weil die Zahl der vorliegenden Einzelmessungen viel zu gering ist und es wegen der

Umständlichkeit der angewandten Meßmethode einer gesonderten Untersuchung bedarf, das dazu erforderliche Tatsachenmaterial zu sammeln.

3. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) in Eiern unter Luftabschluß

Die untere Kurve der Abb. 14 stellt das Ergebnis eines Versuches dar, der auf die gleiche Weise wie der zuletzt beschriebene durchgeführt wurde, nur daß das vermessene Ei in einem ganzseitig mit Paraffin umrandeten Deckglaspräparat lag. Es konnte sich infolge Sauerstoffmangels nicht teilen und zeigte ein konstant niederes RVM von nur etwa $0,2 \mu$. Dieses Präparat wurde bei 25°C mit Paraffin verschlossen zwei Tage aufbewahrt und dann das RVM von diesmal zehn Eiern bestimmt und gemittelt. Die Eier hatten sich in dieser Zeit in keiner Weise verändert und ihr RVM war das gleiche von etwa $0,2 \mu$ geblieben. Daraufhin wurde das Präparat geöffnet und frisches, sauerstoffhaltiges Wasser zugesetzt. 3 Stunden später wurde das RVM erneut aus zehn Eiern gemittelt und betrug nunmehr etwa $0,5 \mu$.

4. Relatives Verschiebungsmittel (RVM) in zentrifugierten Eiern

Ferner sei ein Versuch erwähnt, bei dem sich das RVM in stark zentrifugierten Eiern als ebensogroß wie das der nicht zentrifugierten Kontrolle erwies. Die vermessenen Granula lagen dabei in der im Vorwandern begriffenen Zone der sich beim Wiedereinziehen des „Balles“ im Plasma verteilenden Granula, einer Zone also, in der eine eindeutige überlagernde zweite Bewegung gegeben war. Es kann eingewandt werden, daß eine durch den Eingriff des Zentrifugierens hervorgerufene Intensitätsänderung der GB für die Gleichheit der Ergebnisse von Versuch und Kontrolle verantwortlich zu machen ist. Jedoch ist dieser Einwand als unwahrscheinlich zu bezeichnen.

Vor allen Dingen sollte dieser Versuch zeigen, daß beim Vorhandensein einer weiteren, die Bewegung der Granula eindeutig überlagernden, gänzlich anders verursachten Bewegung trotzdem eine Intensitätsmessung der GB möglich ist.

Praktisch ist dies dann von Bedeutung, wenn man einen Eityp zur Beobachtung hat, bei dem eine sehr dichte Lagerung der Granula die Identifizierung eines Einzelgranulums auf dem Filmteibild unmöglich macht. Man kann sich dann durch ein leichtes Zentrifugieren helfen und zur Auswertung die Granula des Poles benutzen, der durch die beginnende Schlichtung granulärmer geworden ist.

VI. Theoretischer Teil

Aus diesen Befunden wird bezüglich der Kausalität der GB vermutet, daß es sich um eine durch Molekülstöße verursachte Verlagerung mikroskopischer Teilchen von einer für das menschliche Zeitmoment nicht mehr als Bewegung erkennbaren Geschwindigkeit handelt. Die gleiche Ursache also

wie die der BMB. Allein schon aus praktischen Gründen wird für diese extrem langsame Form der BMB die Bezeichnung GB beibehalten, denn während ein kurzer Blick ins Mikroskop zu entscheiden gestattet, ob BMB oder nicht, gelingt die Entscheidung, ob GB oder nicht, erst nach Vorliegen des geeignet gerauschten Filmlaufbildes.

Entsprechend den Baueigentümlichkeiten des lebenden Protoplasmas wird die GB von Fall zu Fall verschiedene Abwandlungen erfahren, ihre Intensität aber als ein zumindest relatives Maß für die Zustandsänderungen der Plasmakolloide mit Vorteil zu verwenden sein.

Dieser Erklärungsversuch wird gegeben, weil er der nächstliegende ist und sich die im vorstehenden dargestellten Befunde in diesem Sinne deuten lassen.

So hört die GB plötzlich auf, wenn das Protoplasma durch Hitze oder andere Insulte koaguliert. Wird die Eizelle durch mechanischen Druck irreversibel geschädigt, ohne daß eine Koagulation eintritt, so geht die Bewegung weiter. Häufig wird sich der Eintritt des Zelltodes durch ein plötzliches Aufhören der GB kundtun, wenn eben mit dem Zelltod eine plötzliche Protoplasmakoagulation einhergeht.

Der umgekehrte Vorgang, eine Steigerung der Bewegungsintensität der GB bis zur BMB, läßt sich experimentell ebenfalls darstellen, indem durch Pressen oder auch im Anschluß an sehr starkes Zentrifugieren durch eine Vermischung des Protoplasmas mit der perivitellinen Flüssigkeit dessen Viskosität herabgesetzt wird. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Granula steigert sich dabei von der Nichtwahrnehmbarkeit bis zu einer schnellen BMB.

Die Temperaturabhängigkeitskurve der GB ergibt sich als die Resultante aus der mit der Temperatur zunehmenden Geschwindigkeit der Granula einerseits und der bei höheren Temperaturen gleichzeitig zunehmenden Protoplasmaverfestigung andererseits.

In der normalen Eizelle lassen neben den scheinbar ruhig liegenden großen Granula die kleinen, nach dem Zentrifugieren am zentrifugalen Pol angehäuften Granula BMB erkennen. Es ist dabei allerdings in der lebenden Zelle schwer zu entscheiden, ob sich solche Körnchen nicht in Vakuolen befinden, was an geeigneten Eiern tatsächlich beobachtet wurde, aber nicht immer der Fall zu sein braucht, wie aus sorgfältigen Beobachtungen mit starker Vergrößerung (Objektiv: W. u. H. Seibert, 150 F) hervorging.

Eine größere Menge von Granula, die massenmäßig zwischen den großen und kleinen Granula stehen und deshalb eine eben erkennbare BMB erkennen lassen müßten, wurde nicht beobachtet.

Es ist dabei natürlich denkbar, daß auf Grund der besonderen submikroskopischen Struktur des Protoplasmas erst unterhalb einer bestimmten Größe Granula BMB zeigen können, während alle größeren eben durch die Struktur nur zu der viel langsameren GB befähigt sind. An sich könnte man erwarten, daß entsprechend den verschiedenen Volumina der Granula auch alle Geschwindigkeitsstufen verwirklicht wären. Tatsächlich sind aber die langsamen eben oder deutlich wahrnehmbaren Bewegungen nicht vorhanden und nur BMB der kleinsten Teilchen oder GB der größeren zu

beobachten. Ferner sei die für die BMB schon lange bekannte Glitschbewegung erwähnt, die auch hier bei der GB nachgewiesen werden konnte.

Für die schnelle, unmittelbar beobachtbare Glitschbewegung von Entoplasmagranula nehmen ältere Untersucher allerdings einen anderen Mechanismus an. Die ebenfalls unmittelbar beobachtbare Eigenbewegung, die von Entoplasmagranula in strömendem Plasma beschrieben wird und meist auf partielle Löslichkeit und damit verbundene Veränderungen der Oberflächenspannungsverhältnisse zurückgeführt wird (Modellversuch: Kämpfer auf Wasser), soll dann als Glitschbewegung in Erscheinung treten, wenn ein Granulum diese Bewegung an irgendeiner Phasengrenze im Protoplasma ausführt (Giersberg 1922). Die Bewegung kann hier nicht gleichmäßig nach allen Seiten des Raumes erfolgen, sondern nur in einer Ebene entlang einer solchen Struktur (Wabenwand etc.).

Außerdem läßt sich in diesem Sinne auch die Kuhlsche Beobachtung deuten, daß stark lichtbrechende Granula unbekannter Herkunft im perivitellinen Raum des Seeigel-Eies GB erkennen lassen. Aus einer unter Zeitraffung ähnlichen Bewegungsform und Geschwindigkeit dieser Granula und denen des Protoplasmas hält er es für möglich, u. U. auch eine ähnliche Viskosität von Protoplasma und perivitelliner Flüssigkeit annehmen zu dürfen.

Am *Parascaris*-Ei wurden solche Granula im perivitellinen Raum nicht beobachtet; jedoch machen es besonders die Preßversuche wahrscheinlich, daß die Viskosität der perivitellinen Flüssigkeit kaum über derjenigen des reinen Wassers liegt. Abgesehen von der nicht ohne weiteres vergleichbaren Viskosität des Gesamtprotoplasmas als einer „Strukturviskosität“ mit der der perivitellinen Flüssigkeit, besteht die Möglichkeit, daß ähnliche Verhältnisse auch am Seeigel-Ei verwirklicht sind und keine so hohe Viskosität der perivitellinen Flüssigkeit anzunehmen ist, wie aus der in ihr stattfindenden GB geschlossen werden müßte. Diese Beobachtungen stützen sich nämlich allein auf die Betrachtung des gerafften Filmlaufbildes, und es besteht durchaus die Möglichkeit, daß die Bewegungsgleichheit der Granula im Protoplasma und in der perivitellinen Flüssigkeit nur eine scheinbare ist und tatsächlich die Granula der perivitellinen Flüssigkeit eine größere Bewegungsgeschwindigkeit zeigten. Auf diese Verhältnisse ist auf Seite 38 ausführlich eingegangen, worauf deshalb verwiesen sei.

Schließlich sei noch ein Modellversuch erwähnt, der an sich nichts Neues oder Unerwartetes bringt und nur deshalb Erwähnung findet, weil die Vorstellung oft Schwierigkeiten bereitet, daß an sich schnelle Molekülstöße tatsächlich eine in der Wirkung sehr langsame Verlagerung mikroskopischer Teilchen bewirken können.

Dazu wurden Karminkörner in dickflüssigem Zedernholzöl verteilt und mit normaler Frequenz aufgenommen. Das Laufbild ließ anschließend nicht die geringste Bewegung der Karminkörner erkennen. Unmittelbar danach wurde die gleiche Stelle 160fach gerafft (= 6 Bilder pro Minute) aufgenommen. Das geraffte Filmlaufbild dieser Einstellung bot nunmehr den Eindruck typischer BMB, die Karminkörner tanzten, sich um sich selbst drehend, im Gesichtsfeld umher und zeigten somit deutlich, daß ihre Ruhe nur eine

scheinbare war und, wie auch die Bewegung der Granula, erst durch die Anwendung der Zeitraffung sichtbar wurde.

Inwieweit sich durch eine Intensitätsmessung der GB absolute Angaben über Viskositätsgrade lebender Protoplasten erhalten lassen, soll hier nicht diskutiert werden. Zu Viskositätsmessungen sehr kleiner Flüssigkeitsmengen dürfte sich die Methode verwenden lassen. Es würde dazu nur ein Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit benötigt.

Die Bedeutung der Intensitätsmessung der GB wird vielmehr in der Möglichkeit erblickt, auf diese Weise ohne jeden Eingriff Aufschluß über die geringsten Zustandsänderungen der Plasmakolloide lebender Zellen zu erhalten. Also nur relative Maße, die aber, was anderen Methoden gegenüber ein besonderer Vorteil ist, in kurzen Zeitabständen beliebig lange an ein und derselben Zelle gewonnen werden können. Die kurze Belichtung für die zur Auswertung nötigen Anfangs- und Endlagen dürfte dabei, als der einzige schädliche Einfluß, dem das untersuchte Material auszusetzen ist, für die wenigsten Objekte von Bedeutung sein.

Zur Auswertung eignen sich selbstverständlich nur Zellen, die selbst keine Eigenbewegung in Form lebhafter amöboider Beweglichkeit, starker Protuberanzenbildung etc. aufweisen oder aus irgendwelchen anderen Gründen auch nicht vorübergehend ruhig zu legen sind. Ferner muß eine plasmatische Granulation am besten in nicht zu dichter Lagerung vorhanden oder experimentell erzeugbar sein. Diese Erfordernisse werden am ehesten von einer Vielzahl von Eizellen erfüllt, und es bleibt abzuwarten, inwieweit Zellen aus Gewebekulturen, überlebende Epithelien oder Zellen aus anderen Körpergeweben dafür verwendet werden können und inwieweit solche Versuche neue Erkenntnisse zu liefern imstande sind.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das von Kuhl als „Granulabewegung“ (GB) bezeichnete Phänomen der nur unter Zeitraffung sichtbaren Ortsveränderung von Protoplasma-Einschlüssen intakter Zellen wird mit Hilfe des Zeitrafferfilms an *Parascaris*-Eiern auf dem Vorkernstadium einer eingehenden Analyse unterzogen.

2. Diese in Wirklichkeit sehr langsamen Bewegungen treten im gerafften Filmlaufbild (80fache Geschwindigkeit) als ein unregelmäßiges Durcheinanderwimmeln der Protoplasmagranula in Erscheinung. Dazu sei bemerkt, daß sich alle Angaben über Bewegungsform und Geschwindigkeit der Granula stets auf das 80fach geraffte Filmlaufbild beziehen.

3. Von Zeit zu Zeit lassen sich Granula beobachten, die mehr oder weniger geradlinig einen auffallend langen Weg zurücklegen. In Analogie zu der formal gleichen Bewegungsweise einzelner Teilchen bei der Brownschen Molekularbewegung (BMB) wird eine solche Bewegung eines Granulums des *Parascaris*-Eies ebenfalls als Glitschbewegung bezeichnet.

4. Ist eine Polstrahlung ausgebildet, so scheint die Bewegung der Granula lediglich in deren unmittelbarem Ausdehnungsgebiet gehemmt zu sein, während in einer kugelschalenförmigen peripheren Plasmazone keine merkliche Beeinflussung der GB durch die Strahlung zu bemerken ist.

5. Eine langsame Temperaturerhöhung im Laufe von zwei Stunden von 5° bis auf 80° C ließ im Laufbild eine geringe Intensitätszunahme der GB beobachten. Nach einem Maximum der Bewegungsintensität hört die GB dann plötzlich auf.

6. In Eiern unter Luftabschluß läuft die GB erheblich verlangsamt ab.

7. Wird ein Ei bis zum Platzen seiner Schale gepreßt, so hört in dem im Schaleninnern verbliebenen Protoplasmarest schlagartig jede Bewegung der Granula auf. Ist der Druck nur so groß, daß die Eischale nicht platzt und sich lediglich Protoplasma und perivitelline Flüssigkeit mischen, so geht die GB weiter und verstärkt sich schließlich derart, daß die Bewegung der Granula subjektiv beobachtbar wird.

8. Intensitätsänderungen der GB während der Vorkernvereinigung und ersten Teilung sowie Strömungen oder andere gerichtete Bewegungen im Protoplasma ließen sich an Hand des 80fach gerafften Filmlaufbildes nicht nachweisen.

9. Weil die normale Eizelle im perivitellinen Raum nicht ruhig liegt, konnte von der „mittleren horizontalen Verschiebung“ der Granula als einem Maß für ihre Bewegungsintensität kein Gebrauch gemacht werden. Es wurde deshalb eine andere Meßmethode entwickelt, die es erlaubt, an Hand der allein zur Verfügung stehenden Projektionswege der Granula ein praktisch ausreichend genaues Maß für die von ihnen ausgeführte GB zu erhalten. Es wird im folgenden als „Relatives Verschiebungsmittel“ (RVM) bezeichnet und gibt an, um welchen Betrag die Granula in einer bestimmten Zeiteinheit im Mittel ihre Lage zueinander ändern.

10. Um die Brauchbarkeit dieser Methode zu belegen, wird als Wichtigstes eine Abhängigkeitskurve des RVM von der Temperatur gegeben und die möglichen Ungenauigkeiten dieser Kurve ausführlich diskutiert.

11. Bezüglich der Kausalität der GB wird aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen, daß es sich um eine durch Moleküstöße verursachte Verlagerung mikroskopischer Teilchen von einer für das menschliche Zeitmoment nicht mehr als Bewegung erkennbaren Geschwindigkeit handelt. Entsprechend den Baueigentümlichkeiten des lebenden Protoplasmas wird die GB von Fall zu Fall verschiedene Abwandlungen aufweisen, ihre Intensität aber als ein zumindest relatives Maß für die Zustandsänderungen der Plasmakolloide mit Vorteil zu verwenden sein.

Literatur

- Autrum, H., 1939: Die Entwicklung von *Parascaris equorum*. Hochschulfilm C 334 mit Beiheft.
- Bataillon, E., 1910: Contribution à l'analyse expérimentale des phénomènes karycinétiques chez *Ascaris megalocephala*. Arch. Entw. med. 30, Teil I, 24.
- Beams, H. W., and King, R. L., 1937: The suppression of cleavage in *Ascaris* eggs by ultracentrifuging. Biol. Bull. 73, 99.
- Weed, Pickels, 1933: The ultracentrifuge. Science 78, 338.
- Bělehrádek, J., 1935: Temperature and Living Matter. Protoplasma-Monographien 8.
- Chambers, R., 1922: The effect of experimentally induced changes in consistency on protoplasmic movement. Proc. Soc. Experm. Biol. a. Med. XIX, 87.

- Einstein, A., 1922: Untersuchungen über die Theorie der „Brownschen Bewegung“. Ostwalds Klassiker Nr. 199. Leipzig 1922.
- Fauré-Fremiet, E., 1913: Le cycle germinatif chez l'*Ascaris megalcephala*. Arch. d'Anat. Micros. 15, 435.
- Frommolt, G., 1934: Die Befruchtung und Furchung des Kanincheneies im Film. Zentralbl. f. Gynäkologie 58, Nr. 1.
- Fry, H. J., and Parks, M. E., 1934: Studies of the mitotic figure. IV. Mitotic changes and viscosity changes in eggs of *Arbacia*, *Cuimigia* and *Nereis*. Protopl. 21, 475.
- Fürth, R., 1930: Über die Messung der Viskosität sehr kleiner Flüssigkeitsmengen mit Hilfe der Brownschen Bewegung. ZS. f. Physik. 60, 313.
- Giersberg, H., 1922: Untersuchungen zum Plasmabau der Amöben im Hinblick auf die Wabentheorie. Arch. Entw.mech. 51, 150.
- Heilbrunn, L. V., 1921: Protoplasmic viscosity changes during mitosis. Jl. Exp. Zool. 34, 417.
- 1928: The colloid chemistry of Protoplasm. Protoplasma-Monographien 1.
- 1930: Protoplasmic viscosity of Amoeba at different temperatures. Protoplasma 8, 58.
- Henriot, E., et Huguenard, E., 1925: Sur la réalisation de très grandes vitesses de rotation. C. r. Soc. Biol. 180, 1589.
- Hogue, M. J., 1910: Über die Wirkung der Centrifugalkraft auf die Eier von *Ascaris megalcephala*. Arch. Entw.-mech. 29, 109.
- Katô, K., 1933: Viscosity changes in the cytoplasm during mitosis as indicated by Bownian movement. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto Imp. 8, 201.
- Kuhl, W., 1937: Die Entwicklung der Bernsteinschnecke *Succinea putris* L. Hochschulfilm C 186 mit Beiheft.
- 1937: Die Entwicklung des Eies der weißen Maus. Hochschulfilm C 244 mit Beiheft.
- 1941 a: Untersuchungen über die Cytodynamik der Furchung und Frühentwicklung des Eies der weißen Maus. Abh. senckenberg. naturf. Ges. Frankf. M. 456, 1.
- 1941 b: Die Entwicklung des Seeigeleies (*Psammechinus miliaris* Gmel). Hochschulfilm C 382 mit Beiheft.
- 1941 c: Die Entwicklung des marinen Anneliden *Pomatoceros triqueter* L. Hochschulfilm C 383 mit Beiheft.
- 1942: Kinematische Zellforschung. Biol. gen. 16, 263.
- 1943: Die Entwicklung des Blaufelchen. Hochschulfilm C 406 mit Beiheft.
- , W. und G., 1949 a: Neue Ergebnisse zur Cytodynamik der Befruchtung und Furchung des Eies von *Psammechinus miliaris* Gmel. Zool. Jahrb. 70, Heft 1.
- , W., 1949 b: Die technischen Grundlagen der kinematischen Zellforschung. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949.
- Lepeschkin, W. W., 1935: Zur Kenntnis des Hitzetodes des Protoplasmas. Protoplasma 13, 349.
- 1937: Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod. Protoplasma-Monographien 12.
- Liesegang, R. E., 1912: Protoplasmastrukturen und deren Dynamik. Arch. Entw.mech. 34, 452.
- Möllendorff, W. v., Beiträge zum Problem der Zellviskosität. Arch. exp. Zellforsch. 19, 263.
- Pekarek, J., 1930: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. I. Mitteilung. Protoplasma 10, 510.
- 1932: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. IV. Mitteilung. Protoplasma 17.

- Pomini, F., 1937: Die Normalentwicklung der Eier von *Ascaris megalocephala* und die mikromorphologischen Wirkungen der Radiumstrahlen in mikrokinematischer Untersuchung (ital.). Atti. Ist. Veneto Sci. 96, 219.
- Smoluchowsky, M. v., 1923: Abhandlungen über die Brownsche Bewegung und verwandte Erscheinungen. Ostwalds Klassiker, Nr. 207. Leipzig.
- Svedberg, The, 1940: Die Ultrazentrifuge. Handb. d. Kolloidwiss. 7.
- Vandebroek, G., 1937: Les mouvements protoplasmiques au cours de la fécondation de l'œuf d'ascidie. Arch. exp. Zellforsch. 19, 411.

Beobachtungen über die Wirkung der Kalilauge auf das Protoplasma

Von

B. J. Cholnoky, Enkhuizen (Nederland)

Mit 15 Textabbildungen

(Eingelangt am 2. Juli 1951)

Die Beobachtungen Schindlers (1938a, 1938b) und Höflers (1939) über den Alkalitod des Plasmas haben meine Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß der in diesen Untersuchungen eingeschlagene Weg wertvolle Auskünfte über das Protoplasma und seine Organellen liefern könnte, wenn man die Wirkungsweise der Alkalien unter dem Mikroskop verfolgt. Wenn man aber eine starke Base in einer Konzentration anwendet, die nicht unmittelbar tödlich ist, bleibt man unter dem Tonus der Zellen, wodurch die nur sehr wenig untersuchten Erscheinungen der Plasmoptyse auftreten. Dabei sind die sichtbaren Veränderungen in den Zellen so gering, ihr Absterben geht so schnell vor sich, daß keine zuverlässigen Schlüsse über die Organisation der Zelle möglich sind.

Versucht man dagegen, starke Basen in einer Konzentration anzuwenden, die iso- oder hypertonisch ist, so erfolgt nur ein rasches Absterben mit den schon durch Schindler und Höfler beschriebenen Nekrosen.

Die Aufgabe ist hier, eine Methode zu finden, die die Untersuchung der Wirkung einer starken Base zuläßt, ohne die Zelle unmittelbar zu töten. Ich glaube, daß ich für die starken Basen (z. B. KOH) in den hier zu beschreibenden Experimenten ein geeignetes Verfahren gefunden habe.

Plasmolysiert man die Blumenblattepidermiszellen von *Calceolaria* mit 1 mol KNO_3 , so entstehen sowohl in den Zellen der rot gefärbten als auch in den der rot gefleckten gelben Blüten Krampfplasmolysen. Es läßt sich dabei feststellen, daß im Protoplasma dieser Zellen mehr oder weniger zahlreiche, lebhaft gelbe Chromoplasten zu finden sind und daß die Vakuole karminrot-karminrosa Anthocyane enthält, die in den Zellen von gelben Blüten (fast) gänzlich fehlen können, d. i. sie kommen hier vielleicht in einer optisch nicht manifestierten Form (Leukoanthocyanine) vor. Die Plasmolyse ist am Anfang sehr krampfartig, d. h. das Plasmalemma zeigt konkave Oberflächen, oft auch Hechtsche Fäden oder dickere Plasmastränge zu den negativen Plasmolyseorten (Abb. 1, 2). In den ersten Minuten wird die Vakuole auch mitgerissen, hier dauert der „Krampf“-Zustand aber höchstens 1 bis 2 Minuten. Nach dieser Zeit erscheinen überall konvexe Formen, die erst durch die Vakuolen angenommen werden. In Abb. 1 ist die starke Krampfform des

Plasma noch gut sichtbar, die Vakuole ist aber schon abgerundet. Das gleiche gilt auch für die in Abb. 2 dargestellte Zelle, die einem dunkelroten Fleck der Blütenblattepidermis entstammt. Hier ist es ganz deutlich, daß auch im Plasma lebhaft rote, konvex kontrahierte, kleine, farbstoffführende Vakuolen erscheinen und daß die abgerissenen Teile der Vakuole wohl eine entmischte, ursprünglich im Plasma diffus vorhandene Phase darstellen.

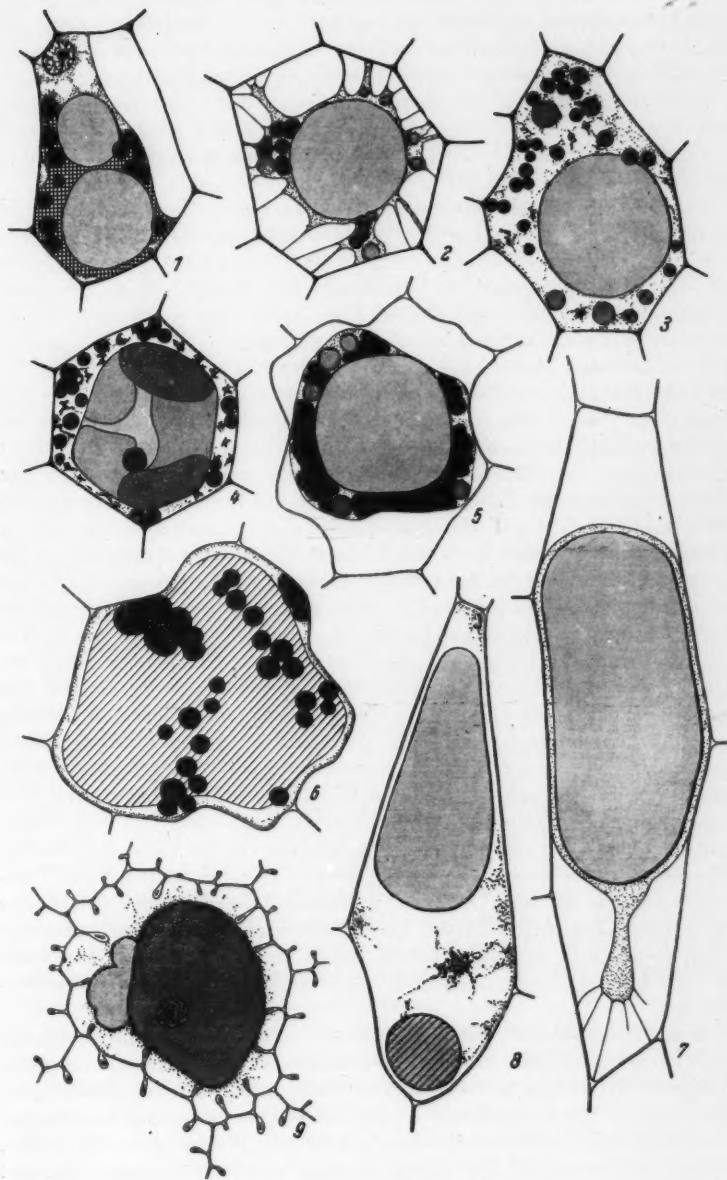
Abb. 1 zeigt die meist sehr bald ziemlich allgemein eintretende Vakuolenkontraktion, die auch hier die Folge einer höheren Permeabilität des Plasmalemmas als des Tonoplasten ist (Cholnoky 1950 c). Daß die höhere Permeabilität die ursprünglichen Viskositäts- und Adhäsionsunterschiede nicht gänzlich aufheben kann, beweisen die auch während der Vakuolenkontraktion (Plasmaquellung) gut sichtbar bleibenden krampfhaften Formen.

Die intrameierenden KNO_3 -Moleküle sind für das Plasma tödlich, wodurch die bekannten überlebenden Vakuolen erscheinen (Abb. 3). Es ist jedenfalls sehr auffallend, daß die Ausbildung der Hechtschen Fäden, Ausgleichung der konkaven Buchten oder ganz allgemein das Eintreten der verschiedenen Plasmolysestadien in einem für die einzelnen Zellen sehr verschiedenen Zeitpunkt eintreten, so daß diese protoplasmatisch voneinander verschieden sein müssen. Das verschiedene protoplasmatische Verhalten der Einzelzellen ist eine protoplasmatische Eigenschaft der *Calceolaria*-Blumenblätter, die ich bisher bei anderen Pflanzen in diesem Maße nicht beobachten konnte.

Die überlebenden Vakuolen können in manchen Zellen auffallend lang „lebend“, d. i. scharf begrenzt und osmotisch wirksam bleiben. In den meisten Zellen kann man aber schon innerhalb weniger Minuten nach der Desorganisation des Plasmas eine Permeationsdeplasmolyse und, als deren Folge, das Platzen und die Desorganisation der Vakuolen beobachten. In denjenigen, die noch für längere Zeit osmotisch wirksam bleiben, manifestiert sich die Permeation des KNO_3 erst nach einer längeren Zeit mit einer langsamen Anschwellung der ursprünglich gleichmäßig karminrot gefärbten Vakuolen. Gleichzeitig mit diesem Vorgang erscheinen in der Vakuole scharf begrenzte, verschieden dunkle Abschnitte einer mehr oder weniger komplizierten Entmischung, so daß in diesen besonders widerstandsfähigen Zellen Bilder entstehen wie in Abb. 4.

Um die protoplasmatische Wirkung einer starken Base untersuchen zu können, habe ich dem Plasmolytikum — 1 mol KNO_3 — 1% 1 mol KOH-Lösung zugesetzt. Auf diese Weise sind alle nachteiligen Folgen einer stark verdünnten Lösung ausgeschaltet, und durch Vergleichung der Plasmolysen mit und ohne KOH-Zusatz kann man die Wirkung dieser Moleküle studieren.

Abb. 1—9. 1—6. *Calceolaria „hybrida“*. Blumenblattepidermiszellen. 1—4. Plasmolyse durch 1 mol KNO_3 . 5—6. Plasmolyse mit 1% 1 mol KOH + 99% 1 mol KNO_3 . 7—8. *Senecio cruentus*. Epidermiszellen der Blumenblattunterseite, plasmolysiert mit 1% 1 mol KOH + 99% 1 mol KNO_3 . 9. *Pelargonium zonale*. Epidermiszelle der Blumenblattunterseite, plasmolysiert mit 1% 1 mol KOH + 99% 1 mol KNO_3 . — Farbenwiedergabe: punktiert = Protoplasma, grau = karminrot oder (Abb. 9) zinnoberrot, schraffiert = blau, schwarz = gelb (Chromoplasten). Vergr. etwa 550/1.



Die Auswirkungen sind schon am Anfang ganz deutlich, da anstatt der Krampfplasmolysen in allen Zellen sogleich konvexe Plasmolyseformen entstehen, was nur durch das Verschwinden aller Adhäsions- und Viskositätsunterschiede — besonders im Plasmalemma — erklärlich ist.

In vielen Zellen beginnt schon nach dem Eintritt der Plasmolyse die Permeationsdeplasmolyse, in anderen dauert es etwas länger, so daß sich auch auf diese Weise die schon beschriebene große protoplasmatische Verschiedenheit dieser Epidermiszellen feststellen läßt.

Gänzlich unabhängig davon, was für einen und wieviel Farbstoff die einzelnen Vakuolen enthalten, verhalten sich einige oder einige Gruppen derselben widerstandsfähiger, in welchen die Vorgänge besser zu beobachten sind. Da die Einzelheiten auch hier die gleichen bleiben, sich aber in einem verlangsamten Tempo abspielen, so kann man diese widerstandsfähigen Zellen als gute Untersuchungsobjekte gebrauchen.

Sie zeigen aufs klarste, daß die KOH- noch viel schneller als die KNO_3 -Moleküle intrameieren, wodurch ganz allgemein eine starke Plasmaquellung entsteht. In diesem Zustand ist eine Zelle aus den dunklen Flecken auf Abb. 5 dargestellt, wo auch die im Zytoplasma entstehenden vakuolenartigen Entmischungen gut sichtbar sind. Die Vakuole zeigt vorläufig keine Veränderung, obzwar das Protoplasma eben vor der Permeationsdeplasmolyse steht. Die KOH- KNO_3 -Mischung beschädigt das Plasmalemma sehr schwer, da in den meisten Zellen innerhalb 5 bis 10 Minuten die Anschwellung des Protoplasmas, gleichzeitig aber eine Veränderung des Farbtons der Vakuolenfarbstoffe zu beobachten ist. Die ursprünglich karminrote Farbe schlägt allmählich — aber verhältnismäßig schnell — in Violettrot, später in Violettblau um. In diesem letzteren Zustand ist auch die Permeation durch Anschwellen der scharf begrenzten Vakuole manifestiert, und gleichzeitig geht das Protoplasma durch Platzen des Plasmalemmas unter heftigen Dislokationen der Chromoplasten zugrunde. In manchen günstigen Fällen konnte ich auch die weitere allmähliche Vergrößerung der Vakuole beobachten, deren Farbe immer mehr nach Himmelblau umschlägt und nach und nach beinahe das ganze Zellumen erfüllt (Abb. 6). Das Absterben tritt immer unter den gleichen eigentümlichen Erscheinungen ein, die Farbe der Vakuole bleibt nämlich rein himmelblau, verbleicht aber plötzlich und auch der Tonoplast ist noch gut sichtbar. Die Zellen können manchmal 30 bis 120 Sekunden lang in diesem Zustand verharren, bis schließlich sowohl die Überbleibsel des Tonoplasts als auch der blaue, bleiche Inhalt im Plasmolytikum verschwinden. Die Chromoplasten bleiben in allen diesen Fällen anscheinend unverändert.

Diese Erscheinungen deuten zweifellos darauf hin, daß das KOH das Plasmalemma gründlich verändert hat; da dieses aber doch nicht unmittelbar inaktiviert worden ist — manchmal bleiben die konvexen Plasmolysen (Abb. 5) bis 20 Minuten sichtbar —, muß ich voraussetzen, daß das Plasmalemma hier nicht nur aus Lipoiden besteht (vgl. Frey-Wyssling 1948, wo auch die Literatur), sonst würde es doch innerhalb der kürzesten Zeit restlos verseift werden. Das gleiche gilt auch vom Tonoplasten, es scheint aber ebenso gesichert zu sein, daß auch das Protoplasma einige Zeit lang

das Eindringen der Moleküle verhindern kann, da die Farbtonänderungen in den Vakuolen nur nach einer weitgehenden Inaktivierung des Protoplasmas — die in der Quellung desselben manifestiert wird — erscheinen. Das Eindringen des KOH, die damit verbundenen p_H -Veränderungen und das Entstehen der K-Verbindung des Farbstoffs gehen auch allmählich von außen nach innen zu, da hier der Umschlag des Farbtons den Weg der eindringenden Moleküle deutlich angibt.

Wenn man anstatt einer Mischung 1:99 eine solche mit 10 Teilen 1 mol KOH und 90 Teilen 1 mol KNO_3 anwendet, kann man die gleichen Erscheinungen, aber in einem sehr beschleunigten Tempo, beobachten. Der Vorgang ist der folgende:

Man sieht eine überall völlig konvexe, energische Kontraktion des Protoplasmas. Vorläufig kann man die Konturen der Vakuolen nicht besonders deutlich sehen, die Lage der Chromoplasten zeigt aber, wo sie zu suchen sind.

Sehr bald beginnt die Anschwellung des Plasmas, die aber innerhalb weniger Minuten durch Platzen des Plasmalemmas und Dislokation der Chromoplasten zu einer schnellen Desorganisation führt. In diesem Zustand sind die Vakuolenkonturen gut sichtbar. Die Vakuolenfarbstoffe bleiben bis zum Anfang der Anschwellung karminrot.

Sobald die Intrameation anfängt, verändert sich auch die Farbe des Zellsaftes, da er allmählich, aber schnell, nach Blauviolett umschlägt. Nach der Desorganisation des Plasmas schwillt auch die Vakuole, allerdings nur sehr mäßig, an, der Tonoplast platzt innerhalb weniger Minuten und der in der Zwischenzeit himmelblau gewordene Farbstoff verschwindet.

Der ganze Vorgang nimmt kaum 4 bis 5 Minuten in Anspruch.

Diese mehrmals wiederholten Versuche deuten auf eine komplizierte Zusammensetzung der Vakuolenkolloide und auch der in diesen befindlichen Anthocyanine hin, so daß diese Befunde in bestem Einklang mit den chemischen Befunden (Karrer und Widmer 1927, Karrer und Strong 1936, Karrer und Weber 1936), aber auch mit meinen protoplasmatischen Untersuchungen (vgl. Cholnoky 1949, 1950 a, 1950 b, 1950 c, 1951 a, 1951 b) stehen. Ich habe es ebendarum für nötig gehalten, diese Versuche durch ähnliche mit farbstoffführenden Blumenblattzellen anderer Pflanzenarten zu ergänzen.

Nach meinen Erfahrungen sind die Anthocyaninverhältnisse in den Epidermiszellen der Blumenblätter von *Senecio cruentus* verhältnismäßig einfach (Cholnoky 1950 a, 1950 b); daher habe ich eine zyklamenrot blühende Pflanze dieser Art als Kontrollobjekt gewählt. Die KNO_3 -Plasmolyse habe ich schon (1950 c) ausführlich beschrieben.

Durch 1% KOH + 99% KNO_3 habe ich auch hier in den meisten Zellen von Anfang an konvexe Plasmolysen erhalten, d. i. die Ausgleichung der Adhäsions- und Viskositätsunterschiede geschieht auch hier unmittelbar nach der Einwirkung des Plasmolytikums. Manchmal konnte ich allerdings schwache Spuren krampfhafter Formen sehen (Abb. 7); in solchen Zellen bleiben negative Plasmolyseorte und Hechtsche Fäden einige Zeit lang erhalten. Hier zeigt sich deutlich, daß das Plasmalemma minder widerstandsfähig gegen KOH als der Tonoplast ist.

Erst nach etwa 30 Minuten, wenn das Protoplasma desorganisiert ist, beginnt das Eindringen des Plasmolytikums in die Vakuole oder in die Vakuolenteile, die nunmehr ihre ursprünglich karminrote Farbe in Bläulichviolett — niemals in Blau — verändern. Es ist merkwürdig genug, daß dieser Vorgang nicht nur in den einzelnen Zellen in verschiedenen Zeitpunkten eintritt, daß vielmehr auch eine große Verschiedenheit in der Permeation bei den Vakuolenteilen derselben Zelle bemerkbar ist. Ein schönes Beispiel liefert die in Abb. 8 dargestellte Zelle, wo im unteren Vakuolenteil das Anthocyan in Blau umgeschlagen hat, im oberen Teil aber noch unverändert ist. Der Vorgang geht hier viel langsamer vor sich als bei *Calceolaria*, so daß man das langsame Anschwellen der Vakuolen und den Umschlag des Farbtöns sehr deutlich beobachten kann.

Aus den beschriebenen Einzelheiten folgt, daß die Struktur des Plasmalemmas und die des Tonoplasts der *Calceolaria*- und *Senecio-cruentus*-Zellen voneinander verschieden sein muß, was man eigentlich auch schon aus den Permeabilitätsstudien Höflers (1942) gefolgert haben könnte.

Diese strukturelle Verschiedenheit tritt noch deutlicher hervor, wenn man 10% KOH + 90% KNO₃ als Plasmolytikum anwendet, da in diesem Falle überhaupt keine Plasmolyse erfolgt. Sobald die Flüssigkeit die Zellen von *Senecio cruentus* erreicht, schlägt die Farbe der Vakuolenfarbstoffe in ein etwas schmutziges Indigoblau um, und der so veränderte Vakuoleninhalt exosmiert innerhalb von 1 bis 2 Minuten.

Es ist in diesem Falle deutlich, daß bei dieser Konzentration der Lauge sowohl das Plasmalemma als auch der Tonoplast praktisch momentan vernichtet und dadurch die freie Permeation des Plasmolytikums bis in die Vakuole ermöglicht wurde. Der Vergleich des Vorgangs bei *Senecio cruentus* mit dem bei *Calceolaria* oder bei *Pelargonium zonale* beweist die Richtigkeit der Annahme einer strukturellen Verschiedenheit noch mehr.

Auf Grund unserer bisherigen Kenntnis über die Struktur dieser Hautschichten (Frey-Wyssling 1948) könnte man vielleicht annehmen, daß diese nicht mono- oder polymolekular sind, vielmehr ein kolloides System darstellen, in welchem verschiedene Phasen in verschiedenen Verhältnissen miteinander gemischt vorkommen. Die Annahme wäre wirklich plausibel, daß Hautschichten, in welchen die lipoiden Phasen dominieren, durch Verseifung schneller, dagegen diejenigen, in welchen Eiweißphasen die größte Rolle spielen, langsamer durch KOH zerstört werden. Daß diese teilweise arteigene, zum anderen Teil aber auch an gewisse Zellsorten gebundene Zusammensetzung der osmotisch wirkenden Schichten auch ein verschiedenes Filtriervermögen und dadurch eine spezifische Permeabilität bedingen muß, ist selbstverständlich.

Um die beobachteten Tatsachen zu kontrollieren, habe ich nach einer Pflanze gesucht, die kein Anthocyanin, sondern einen anderen Farbstoff in den Vakuolen der Blumenblattzellen führt. Eine solche ist *Pelargonium zonale* mit ihrem Pelargonin-Gehalt (vgl. über die Farbstoffe Blank 1947). Da außer meinen schon angeführten Untersuchungen auch andere chemische und physiologische Beobachtungen die Lebenswichtigkeit und physiologische

Bedeutung der Vakuolenfarbstoffe immer mehr wahrscheinlich machen (vgl. Blank 1947, Floren 1941, Reichel und Burkart 1938) oder zumindest die Auffassung, nach der diese einfach als Abfallstoffe aufzufassen seien (Frey-Wyssling 1942), sehr unwahrscheinlich machen, habe ich eine weitere Kontrolle der beobachteten Erscheinungen für nötig gehalten.

Bei *Pelargonium zonale* fängt die Plasmolyse durch 1 mol KNO_3 in Krampfform an, die negativen Plasmolyseorte sind meist an die Lamellen der Zellwand gebunden. Die Permeabilität der Zellen ist für KNO_3 sehr groß, da die konkaven Formen schon in den ersten Minuten in konvexe übergehen. Nach einer Plasmolyse von 15 Minuten kann man die Anschwellung der Protoplasten schon gut beobachten, sie erreichen aber niemals die Zellwände, da sowohl Plasmalemma als Tonoplast in einem gewissen Stadium platzen und der Farbstoff herausdiffundiert. Der Vorgang weicht von dem bei *Calceolaria* sehr auffallend ab, nicht nur, da hier alle Phasen der Plasmolyse sich in allen Zellen ungefähr gleichzeitig abspielen, sondern besonders, da ich hier niemals eine Vakuolenkontraktion oder Anschwellung des Plasmas feststellen konnte. Der Verlauf der Plasmolyse ist auch durch das Fehlen überlebender Vakuolen und durch den während des ganzen Prozesses unverändert bleibenden Vakuoleninhalt gut charakterisiert.

Die Plasmolyse mit der Mischung 1% 1 mol KOH + 99% 1 mol KNO_3 weicht von der beschriebenen prinzipiell ab. In dieser Lösung ist die Gleichmäßigkeit der Reaktion viel weniger ausgeprägt. Die Zellen plasmolisieren jedenfalls gänzlich uniform konvex, d. i. auch hier wurden die Verschiedenheiten in der Adhäsion des Plasmalemmas und auch die ungleichmäßige Viskosität eliminiert.

Nach dem Eintritt der Plasmolyse verhalten sich die Zellen in verschiedener Weise. Die Protoplaste der meisten Zellen verharren ziemlich lang (bis zu 30 Minuten) in ihren konvex begrenzten Formen. In dieser Zeit geht sowohl das Plasmalemma als auch das Protoplasma selbst zugrunde, meistens aber ohne eine Quellung oder Anschwellung zu zeigen. Im Zeitpunkt des Absterbens dieser Organellen zeigen die Vakuolen plötzlich eine sich mehr oder weniger schnell entwickelnde Ausstülpung (Abb. 9), die nach einiger Zeit (3 bis 5 Minuten) platzt, und der Inhalt der Vakuole tritt ohne Farbtonveränderung in die Umgebung aus. Die eingehende Untersuchung des Vorgangs zeigt, daß hier der Tonoplast schon früher — im Gegensatz zu allen bisherigen Beobachtungen — sozusagen zur Erstarrung gebracht wurde. Er ist als eine spröde Schicht um die Vakuole geblieben, die endlich dieses rein mechanische Hindernis durchbrechen konnte. Hier muß aber auch der Vakuoleninhalt mit einer Hautschicht umgeben sein, da man sein Platzen usw. klar beobachten kann. Erst nach dem Platzen diffundiert der rote Farbstoff frei in die Umgebung hinaus.

Diese Befunde wurden auch durch die Untersuchungen von Toth (1951) mit dem Mikromanipulator bestätigt, die eigenartige, in den Zellen der durch mich untersuchten *Pelargonium*-Art nicht vorkommende „Anthocyankörper“ gefunden hat, die dieselbe Starrheit zeigten wie hier die ganze Vakuole. Es wäre möglich, daß hier die farbstoffführende Phase — oder eine dieser

Phasen — unter Umständen so außerordentlich erstarren kann. (In diesem Falle ließe sich daran denken, daß das Protoplasma auch Stoffe enthält, die ebenso erstarren können.) Es sei bemerkt, daß der Farbstoff Pelargonin seit Willstätter und Bolton (1915) ziemlich gut bekannt ist und auch in der neuesten Zeit vielfach untersucht wurde (vgl. Blank 1947). Der Farbstoff selbst kann aber kaum für die Erstarrung verantwortlich gemacht werden.

Ein kleinerer Teil (etwa 10 bis 15%) der Zellen reagiert gänzlich anders. In diesen konnte ich vorübergehende Entmischungen sehen (Abb. 10), die aber innerhalb von 5 bis 10 Minuten wieder verschwinden. Es ist zweifellos, daß in diesen mehrere Phasen entmischt werden, und sehr wahrscheinlich, daß einzelne dieser unter gewissen Umständen auch im normalen Lebenszyklus der Zellen auftreten und wahrscheinlich auch die „Anthocyanophore“ (Toth 1951) bilden können.

In diesen Zellen stirbt das Protoplasma auch sehr rasch ab und gleichzeitig erscheinen grobe, blauviolette, dunkle Entmischungskörner in der Vakuole, die noch stets scharf umgrenzt in dem sonst beinahe „leeren“ Lumen sichtbar ist (Abb. 11).

Einige Zeit lang bleibt die Vakuole noch durch den Tonoplasten begrenzt und auch diffus und gleichmäßig, aber nur sehr licht zinnoberrot gefärbt.

Diese Erscheinungen lassen darauf schließen, daß hier eine Phase durch die Einwirkung des eindringenden KOH als violettblaue Körnchenhaufen entmischt (koaguliert?) wurde. Der kleinere Teil des Pelargonins (oder eine andere Verbindung des Pelargonidins) erfüllt als licht gefärbte Flüssigkeit die Vakuole, die nach diesem Vorgang alsbald platzt, worauf der rote Inhalt in die Umgebung herausdiffundiert. Im Lumen bleiben nur die violetten Entmischungs- (Koagulum-?) Körnchen mit unverändertem Farbton und merkwürdigerweise auch der „fixierte“ Kern zurück (Abb. 12). In diesen Zellen ist somit wahrscheinlich eine K-Verbindung des Pelargonidins entstanden, die eine blaue Farbe aufweist (vgl. Blank 1947).

Wenn ich als Plasmolytikum 10% 1 mol KOH + 90% 1 mol KNO₃ anwandte, konnte ich einen ganz veränderten Verlauf des Vorgangs beobachten. Die Plasmolyse und das Absterben ging in diesem Falle sehr schnell vor sich, innerhalb 5 bis 7 Minuten waren alle Zellen völlig desorganisiert. Die Plasmolyse fängt auch hier unmittelbar konvex an. Im weiteren Verlauf lassen sich auch hier zwei Zelltypen unterscheiden. Der größte Teil der Zellen zeigt bald eine kleine Anschwellung des Plasmas, in welchem gleichzeitig blauviolette, unregelmäßige Entmischungskörner erscheinen (Abb. 13). Da die Farbe und auch andere Eigenschaften dieser blauvioletten Körper mit den schon beschriebenen, in den Vakuolen entstehenden Pelargonidin-Verbindungen völlig identisch sind, muß ich annehmen, daß auch im Plasma eine farblose Leuko-Verbindung des Pelargonidins vorhanden ist. Diese Tatsache könnte vielleicht durch weitere Untersuchungen wertvolle Angaben über die Entstehung der Vakuolenfarbstoffe liefern.

Die Ausdehnung des Plasmalemmas und Anschwellung des Protoplasmas ist aber nur von kurzer Dauer; sehr bald platzt die Hautschicht und das Protoplasma geht zugrunde. Zwischen den Resten bleiben aber die kleinen

plasmatischen Entmischungen auch weiterhin in unverändertem Farbton sichtbar. Die Vakuole bleibt vorläufig auch weiterhin rot (Abb. 14). Mit der Desorganisation des Plasmas scheint aber das KOH einen freien Weg zur Permeation erhalten zu haben, da jetzt der Farbton der Vakuole allmählich, aber rasch, über Karminrot-Violettrot in Blauviolett umschlägt, was zeigt, daß

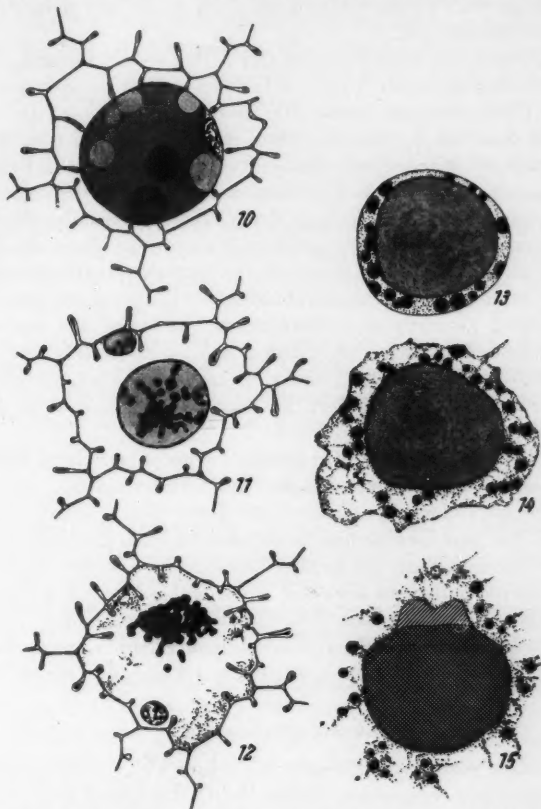


Abb. 10—15. Epidermiszellen der Blumenblattunterseite von *Pelargonium zonale*. 10—12. Plasmolysiert mit 1% 1 mol KOH + 99% 1 mol KNO₃. 13—15. Mit 10% 1 mol KOH + 90% 1 mol KNO₃. — Bei den Abb. 13—15 sind die Zellwände weggelassen. — Farbenwiedergabe: punktiert = Protoplasma, grau = zinnoberrot, schraffiert oder schwarz = blauviolett. Vergr. etwa 550/1.

hier die bekannten blauen K-Verbindungen entstehen. Der Vorgang verändert sicher auch den Tonoplasten, der nach dem Eindringen des KOH erstarrt erscheint. Hier entsteht nämlich eine ebensolche Ausstülpung, wie ich sie bei der anderen Versuchsreihe beschrieben habe, hier aber mit einem blauviolettten Inhalt. Die Ausstülpungen wachsen noch weiter, sehr bald

platzen aber auch sie auf, sie müssen also auch mit einer Hautschicht umgeben gewesen sein (Abb. 15).

In beiden Fällen — mit 1% und mit 10% KOH — ist es ganz deutlich, daß der ausströmende Vakuoleninhalt eine niedrige Viskosität besitzt, so daß sich die beschriebene Erstarrung nur auf den Tonoplasten erstreckt. Vermutlich nehmen an dem Erstarrungsprozeß auch Stoffe aus dem Protoplasma oder aus der Vakuole teil.

Bei einem anderen, kleineren Teil der Zellen — die unregelmäßig unter den zu dem beschriebenen Typus gehörigen Zellen verteilt sind — geht anstatt des Plasmalemmas zuerst der Tonoplast zugrunde. In den ersten Stadien verhalten sich auch diese Zellen mit den anderen ganz gleichartig, in dem in Abb. 15 dargestellten Zustand tritt aber eine hohe Permeabilität des Tonoplasmas auf, die durch die vorzeitige Farbtonveränderung (in Karmin, später für eine kurze Zeit in Violett) des Vakuolenfarbstoffes deutlich wird. Innerhalb weniger Sekunden entmischt sich dann eine Phase der Vakuolenkolloide, die in der Form eines blavioletten Körnchenhaufens sichtbar wird. Gleichzeitig verlieren die Vakuolenkonturen (Tonoplasten) ihre Deutlichkeit, um endlich gänzlich zu verschwinden. So bleibt nur der entmischte blaviolette Körnchenhaufen im Plasma, das — noch stets streng konvex plasmolysiert — innerhalb des Plasmalemmas sichtbar ist. Einige Zeit lang bleibt dieser Zustand unverändert, bis auch das Plasmalemma platzt und der Protoplast desorganisiert.

Ich kann keine Erklärung dafür geben, warum in der einen Zelle die eine und in der anderen die andere Art des KOH-Todes eintritt, vermute aber, daß hier der physiologische Zustand der Zelle (Trauma usw.) eine große Rolle spielt. Aus dem Gesagten geht aber hervor, daß die Resistenz und die osmotischen Eigenschaften der beiden Hautschichten voneinander verschieden sind. Daraus muß man aber auf einen wahrscheinlich prinzipiell verschiedenen Bau der beiden Lamellen schließen und vermuten, daß ihr Bau während des Lebens der Zelle Veränderungen erleiden kann. Sonst wäre die Verschiedenheit der beiden beschriebenen Plasmolysetypen kaum verständlich.

Zusammenfassung

1. Die Plasmolyseformen, die man mit reiner KNO_3 -Lösung erhält, wurden mit denjenigen verglichen, welche KNO_3 -Lösungen mit 1 bzw. 10% Zusatz mol KOH-Lösung liefern. Der Vergleich kann wertvolle Befunde liefern, da so die Wirkung des KOH auf das Protoplasma einigermaßen unmittelbar zu beobachten ist.

2. Da auch die 10 Vol.% KOH enthaltenden KNO_3 -Lösungen in vielen Zellen eine Plasmolyse verursachen, muß man annehmen, daß die osmotisch wirksamen Hautschichten der Zelle nur teilweise aus Fettmolekülen bestehen. Besonders widerstandsfähig (wenig fettreich) ist der *Calceolaria*-Tonoplast.

3. Da bei *Senecio cruentus* bei der Anwendung der Mischlösung keine Plasmolyse eintritt, muß man annehmen, daß hier viel mehr Lipide in den Hautschichten vorhanden sind, die durch Verseifung ausgeschaltet werden. Damit wird aber sehr wahrscheinlich, daß sowohl Plasmalemma als Tono-

plast bei den verschiedenen Pflanzenarten, wahrscheinlich auch bei den verschiedenen Geweben derselben Pflanze, verschieden gebaut sind. Diese Beobachtung steht in bestem Einklang mit der spezifischen Permeabilität.

4. Die Beobachtungen über die Intra- und Permeation des KOH schließen die Möglichkeit einfacher, molekularer Hautschichten aus, da eine solche, aus Lipoiddipolen bestehende Schicht schon bei der Passage der ersten KOH-Moleküle zerstört werden müßte. Ein kolloider Bau mit zumindest zwei Phasen erklärt nicht nur die beobachteten Erscheinungen, sondern auch diejenigen der spezifischen Permeabilität.

5. Vermutlich verursacht die Zerstörung der einen Phase oder mehrerer Phasen der Hautschichtkolloide die Unterschiede im Plasmolyseverlauf, aber auch die Verschiedenheiten zwischen Plasmalemma und Tonoplast.

6. Das Verhalten der Vakuolenfarbstoffe spricht für eine kolloide Bindung dieser Stoffe, da die reversiblen und irreversiblen Entmischungen in dem einen und die Diffusion in dem anderen Falle kaum auf eine andere Weise verständlich wären.

7. Ein weiterer Beweis für die kolloide Bindung der Farbstoffe sind die Änderungen im Farbton nach dem Ausdiffundieren, besonders infolge Einwirkung der 10% KOH, da bei *Calceolaria* die rein blaue Farbe (K-Verbindung) oft erst nur während des Freiwerdens aus dem Mizellarverband entsteht.

Literatur

- Blank, F., 1947: The anthocyanin pigments of plants. Botanical Review 13, 241.
- Cholnoky, B. J., 1949: Zytomorphologische Untersuchungen durch Lebendfärbung an *Primula malacoides*-Zellen. Botaniska Notiser 163.
- 1950 a: Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung an den Epidermiszellen der *Senecio cruentus*-Blumenblätter. Österreichische Botanische Zeitschrift 97, 380.
- 1950 b: Beobachtungen über die Farbstoffaufnahme anthocyanführender Zellen. Mikroskopie 5, 117.
- 1950 c: Einfluß des Plasmolytikums auf den Verlauf der Plasmolyse bei den Epidermiszellen der Blumenblätter von *Senecio cruentus* („*Cineraria*“ Hort.). Portugaliae Acta Biologica III, 69.
- 1951 a: Über farbstoffführende Zellen der *Nemesia strumosa*-Blumenblätter. Protoplasma 40, 152.
- 1951 b: Über einige nekrobiotische Erscheinungen in farbstoffführenden Vakuolen. Mikroskopie 6, 91.
- Floren, G., 1941: Untersuchungen über Blütenfarbmuster und Blütenfärbungen. Flora 35, 65.
- Frey-Wyssling, A., 1942: Zur Physiologie der pflanzlichen Glukoside. Naturwissenschaften 30, 500.
- 1948: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York.
- Höfler, K., 1939: Nekroseformen pflanzlicher Zellen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 56, 451.
- 1942: Unsere derzeitige Kenntnis von den spezifischen Permeabilitätsreihen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 60, 179.

- Karrer, P., und Widmer, R., 1927: Untersuchungen über Pflanzenfarbstoffe. I. Über die Konstitution einiger Anthocyanidine. *Helv. Chim. Acta* 10, 5.
- und Strong, F. M., 1936: Reindarstellung von Anthocyanen durch chromatographische Analyse. *Helv. Chim. Acta* 19, 25.
- und Weber, H. M., 1936: Zerlegung natürlicher Anthocyan gemische durch chromatographische Adsorptionsanalyse. II. Über „Althaein“. *Helv. Chim. Acta* 19, 1025.
- Reichel, L., und Burkhart, W., 1938: Über biogenetische Beziehungen der Anthocyanidine zu Flavonfarbstoffen und Catechinen; Chemie und Biochemie der Pflanzenfarbstoffe. 10. Mitt. *Liebig's Annalen* 553, 98.
- Schindler, H., 1938 a: Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. *Protoplasma* 30, 186.
- 1938 b: Tötungsart und Absterbebild. II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. *Protoplasma* 30, 547.
- Toth, A., 1951: Mikrurgische und mikrochemische Untersuchungen der festen Anthocyankörper im Blütenblatt von *Pelargonium zonale*. *Protoplasma* 40, 187.
- Willstätter, R., und Bolton, E. K., 1915: Untersuchungen über Anthocyane. IV. Über den Farbstoff der Scharlachpelargonie. *Liebig's Annalen* 408, 42.

Sphärit-Bildung aus *Cirsium*-Zellsaft

Von

Griseldis Kenda, Irmtraud Thaler und Friedl Weber

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 8. Juli 1951)

In der Umgebung von Graz findet man nicht selten Exemplare von *Cirsium arvense*, bei denen Blätter und Stengel im oberen Teil des Sprosses nicht grün sind, sondern blaß, gelblichweiß. Um eine Erkrankung infolge Infektion mit dem Pilz *Puccinia suaveolens*, der auf dieser Pflanze häufig vorkommt, dürfte es sich nicht handeln, da sich keine Sporenlager entwickeln. Eine Deformation der Blätter und eine Reduktion der Stacheln, wie dies für rostkranke *Cirsium arvense*-Pflanzen angegeben wird (Köhler 1932), tritt an der Pflanze, die vermutlich als die Varietät *horridum* Wimm. et Grab. (= var. *spinosissimum* Nell.) anzusprechen ist (Hegi 1936: 904), nicht ein. Wir vermuten, daß die Krankheit eine Virose ist.

Im Zellsaft jeder Epidermiszelle der Ober- und der Unterseite solcher erkrankter Blätter befindet sich je ein ansehnlicher Tropfen, der durch seine starke Lichtbrechung und seinen matten Glanz auffällt. In den Schließzellen fehlt dieser Tropfen (Abb. 1). Die Mehrzahl dieser Tropfen erscheint zunächst homogen, strukturlos, doch finden sich gleich auch Kugeln, die eine radiär strahlige Struktur aufweisen und somit wie Sphärokristalle aussehen. Bleiben Epidermisschnitte einige Minuten in Wasser liegen, so wandeln sich auch weitere der ursprünglich homogenen Tropfen in Sphärokristalle um. Diese Gebilde sind doppelbrechend, die Doppelbrechung, die anfänglich schwach ist, wird allmählich stärker. Das Volumen der Sphärite kann nach dem Absterben der Zellen zunehmen. Während die homogenen Tropfen auf Alkoholzusatz verschwinden, bleiben die Sphärite dabei erhalten.

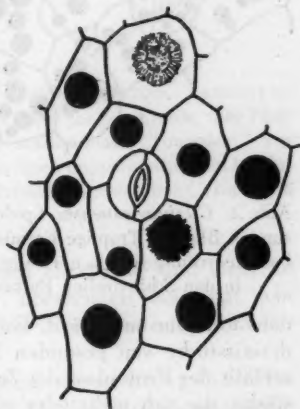


Abb. 1. *Cirsium arvense*. Epidermiszellen eines kranken Blattes mit Entmischungskugeln im Zellsaft und Sphäriten. In den Schließzellen keine Kugeln.

Das Aussehen der Sphärite, das im übrigen recht verschieden sein kann, ihre Doppelbrechung und der Umstand, daß *Cirsium arvense* eine Komposite ist, für die das Vorkommen von Inulin bekannt ist (Wehmer, Ties und Hadders 1932: 885), ließ zunächst daran denken, daß die Sphärite aus Inulin bestehen könnten. In der Regel ist Inulin allerdings nur in Speicherorganen nachzuweisen, bei Kompositen wurde es aber auch im Blatt gefunden, z. B. bei *Petasites* (Fischer 1898) und bei *Cichorium* (Grafe und Vouk 1912). Es muß jedoch an die Mahnung von Fischer (1902: 103) erinnert werden: „Es ist nicht alles Inulin, was in Kompositen vorkommt und Sphärite bildet.“ Gegen die Inulin-Natur spricht neben anderem, daß dieses

Polysaccharid in der lebenden Pflanze „stets gelöst“ vorkommt (Molisch 1923: 135). Inulin-Sphärite werden ja meist so erhalten, daß man Pflanzenteile in Alkohol einlegt, wobei das Inulin allmählich in Form von Sphärokristallen ausfällt (Leitgeb 1887: 888). Die Zellen der erkrankten *Cirsium*-Blätter, in denen sich die Kugeln und Sphärite befanden, waren aber lebend oder wenigstens noch lebend.

Im Zellsaft der Oberhautzellen grüner Blätter gesunder Pflanzen sind, wenn man die Schnitte oder abgezogenen Epidermisstreifen gleich nach

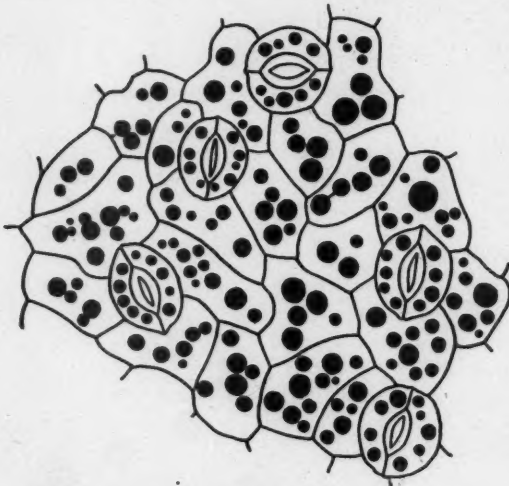


Abb. 2. *Cirsium arvense*. Epidermiszellen eines gesunden Blattes. Tropfige Entmischung des Zellsaftes bei Einwirkung von $\frac{1}{200}$ normaler Schwefelsäure. Auch in den Schließzellen Entmischungskugeln.

der Entnahme untersucht, Tropfen oder Sphärite nicht zu sehen. Werden Epidermisstücke von gesunden Blättern in 30% Glycerinlösung eingelegt, so zerfällt der Protoplast der Zellen durch die überstürzte Plasmolyse in Teilstücke, die sich mehr oder weniger rasch abkugeln; ein Teil dieser Protoplastenfragmente enthält einen durch die Wasserentziehung eingedickten, stark lichtbrechenden Vakuolenteil. Nach etwa zehn Minuten oder erst später nehmen die Vakuolentropfen Sphärolithstruktur an und erweisen sich dann als doppelbrechend.

Obige Beobachtungen ließen sich nur an Pflanzen machen, die Ende Mai gesammelt wurden; um vier Wochen später vom gleichen Fundorte eingebrachte Pflanzen zeigten in den Epidermiszellen die erwähnten Kugeln zunächst nicht und verhielten sich auch sonst anders. Bei diesen älteren Pflanzen bildeten sich Sphärite erst postmortal und meist außerhalb der Zellen, jedenfalls aber nicht durch unmittelbare Umwandlung von Kugeln.

Auch bei diesen Pflanzen sowie bei gesunden läßt sich eine Tropfenbildung im Zellsaft der Oberhautzellen sofort erzielen, wenn man die Epidermisstreifen in eine verdünnte Schwefelsäurelösung ($\frac{1}{20}$ normal) einlegt (Abb. 2). Dagegen tritt in Coffeinelösungen, mit denen Bokorny schon 1889 bei verschiedenen Pflanzen eine „Ausscheidung von Eiweißkügelchen aus dem Zellsaft und nachheriges Verschmelzen derselben zu größeren Kugeln“ erhalten hat¹, bei *Cirsium* eine solche Entmischung nicht ein.

Die Methode, durch Einlegen in konzentrierte Glycerinlösung Sphärite im Gewebe zu erzeugen, hat zuerst Kraus (1877) beschrieben, sie wurde auch von Leitgeb (1888) bei seinen eingehenden Studien über die Entstehung der Sphärokristalle angewendet. Die Bildung der Inulinsphärite erklärte man sich bei dieser Versuchsanordnung durch den Wasserentzug in der Glycerinlösung. Der Vorgang der Plasmolyse (De Vries 1877), um den es sich dabei handelt, konnte zur damaligen Zeit weder Kraus noch Leitgeb schon so gut bekannt sein, wie er dies heute ist. Immerhin haben die beiden Autoren den Vorgang sehr genau beobachtet. Kraus beschreibt ihn folgendermaßen: „Legt man einen dünnen Längsschnitt aus dem Gewebe einer Inulinpflanze in Glycerin von der üblichen Concentration, so sieht man unter dem Mikroskop ... in jeder Zelle alsbald von der Wand eine stark lichtbrechende Masse sich abheben, die allmählich die Contour der Zelle, nur abgerundet, nachahmt, allmählich sich aber mehr und mehr zu einer Kugel zusammenzieht. Wie man sich ... überzeugen kann, hat man hier einen sehr concentrirten Tropfen vor sich. Früher oder später aber wird aus diesem Tropfen ein Sphärokristall.“

Beim Zusatz von konzentrierter Glycerinlösung, wie sie Leitgeb zur Erzeugung von Inulin-Sphäriten im Gewebe der *Dahlia*-Knolle angewendet hat, werden die Protoplasten und Vakuolen durch den raschen Wasserentzug zerteilt und zerrissen und die Protoplastenfragmente sterben vielfach frühzeitig ab. Die Folge davon ist, daß die Inulinsphärite ebenso wie bei der Alkoholeinwirkung meist nicht in strenger Lokalisation in der Zelle entstehen. Läßt man aber die Plasmolyse in schonender Weise eintreten, indem man zum Präparat Rohrzuckerlösungen steigender Konzentration bis etwa 2 mol und darüber zutreten läßt, so kann in der Mitte jeder intakten



Abb. 3. *Dahlia variabilis*. Parenchymzelle aus einer jungen Knolle. Bei Plasmolyse entstandener Tonoplast, zur Gänze in einen doppelbrechenden Inulin-Sphärokristall umgewandelt. Cytoplasma abgestorben.

¹ Vgl. auch Loew und Bokorny 1892.

Zelle ein einzelner plasmolysierter Protoplast erzielt werden. Obwohl dabei der Vakuoleninhalt stark eingedickt wird, so fällt das Inulin noch nicht in Form des Sphärokristalls aus. Der Tonoplast ist, solange der plasmolysierte Protoplast noch lebt, nicht doppelbrechend. Stirbt aber der Protoplast, wobei nur mehr der Tonoplast „lebend“ bleibt, so wird sein Inhalt plötzlich doppelbrechend. Das Volumen des Tonoplasten verändert sich dabei nicht merklich und auch seine Gestalt nicht, so daß auf diese Weise in strenger Lokalisierung in situ ein vollkommen kugelliger Inulinsphärit erhalten wird (Abb. 3). Es ist dies auch der exakte Beweis dafür, daß das Inulin nicht im Cytoplasma, sondern in der Vakuole enthalten ist. Der Umstand, daß die Sphäritbildung nicht in vivo, sondern post mortem des Protoplasten erfolgt, spricht wohl dafür, daß beim Absterben des Protoplasten doch auch am „überlebenden“ Tonoplasten (Vakuolenhaut und -inhalt) Veränderungen vor sich gehen.

Der Plasmolyseversuch läßt sich mit dem gleichen Erfolge der Sphäritbildung ebenso wie mit *Dahlia* auch mit den Epidermiszellen von *Cirsium* durchführen.

Daß Eindickung des Zellsaftes durch Plasmolyse zur Sphäritbildung von in ihm enthaltenen Substanzen führen kann, ist leicht verständlich, paradox erscheint es aber, daß in den wasserhaltigen Zellen der kranken *Cirsium*-Blätter anscheinend in vivo schon die Sphärokristall-Bildung einsetzt. Vielleicht ist dabei die Tropfenbildung im Zellsaft, die der Sphäritentstehung vorangeht, von Bedeutung. Es entstehen zuerst meist zahlreiche kleine Tröpfchen, die sich rasch vergrößern und zusammenfließen. Es ist dies ein Vorgang, den man in den Epidermiszellen vieler Pflanzen (allerdings oft erst bei Vitalfärbung mit Neutralrot) beobachten kann². Der Prozeß wird in der Regel als „Entmischung“ bezeichnet, er stellt aber wohl eine Koazervation dar. Die Koazervation (Bungenberg de Jong 1932, 1936) beruht darauf, daß unter bestimmten Umständen in hydrophilen Solen Entmischungserscheinungen auftreten können, bei denen sich ein kolloidreicher, flüssiger Teil absondert. Für diese kolloidreiche Phase wurde, um die Eigenart der Entstehung zum Ausdruck zu bringen, die Bezeichnung Koazervat geprägt.

Wir nehmen nun an, daß in dem wasserarmen Koazervattropfen, der sich im *Cirsium*-Zellsaft gebildet hat, die fragliche Substanz so angereichert ist, daß sie zur Sphäritbildung neigt. Es soll damit nicht gesagt sein, daß die auf solche Weise entstandenen Sphärite chemisch einheitlich sind und keine Beimengungen enthalten. Es sei auch daran erinnert, daß nach Gicklhorn (1929: 378) im Zellsaft von *Symphoricarpus* frische „Entmischungskugeln“ Doppelbrechung zeigen, diese aber nach einiger Zeit wieder verschwindet.

Der Unterschied im Verhalten der Epidermis der kranken und der gesunden *Cirsium*-Blätter wäre darin zu suchen, daß in den gesunden Oberhautzellen der Zellsaft ohne Alteration von außen nicht zur Koazervation (Kugelbildung) schreitet, in den kranken aber schon von selbst. Ob dies in-

² Ein besonders günstiges Objekt zum Studium dieser „Entmischung“ im vital gefärbten Zellsaft stellen die Oberhautzellen der weißen Korollenblätter von *Polemonium mexicanum* dar. Über die Bildung von „Entmischungskugeln“ siehe u. a. Küster (1935: 360).

folge einer höheren Konzentration des Kolloids im Zellsaft der kranken Zellen so ist oder aus anderen Gründen (erhöhte Labilität der Vakuolenflüssigkeit), läßt sich nicht sagen.

Die Koazervat-Tropfen des Zellsaftes von *Cirsium* sowie die Sphärite zeigen im Fluoreszenzmikroskop blutrote Eigenfluoreszenz. Werden die Zellen, in denen sich Tropfen gebildet haben, mit Akridinorange in saurer Lösung fluorochromiert, so fluoresziert der offenbar kolloidärmere Zellsaft intensiv grün, der darin suspendierte, kolloidreichere Koazervattropfen leuchtend rot. Boerner-Patzelt (1951) hat jüngst auf die „farbändernden Faktoren bei Fluorochromierung“ hingewiesen. Es käme für unseren Fall in erster Linie der Konzentrationseffekt in Betracht oder der Hydratationsgrad, da Rotfluoreszenz durch Dehydratation begünstigt wird. Nach Höfler, Toth und Luhan (1949) ist für den Unterschied der Fluoreszenzfarbe der Zellkerne die verschiedene Bindung des Fluorochroms maßgebend; nach Strügger (1949) handelt es sich um einen Konzentrationseffekt.

Wie früher erwähnt, dachten wir ursprünglich daran, die bei *Cirsium* sich bildenden Sphärokristalle seien Inulin-Sphärite. Für Inulin wird zwar das Vermögen zu fluoreszieren angegeben (Pringsheim und Gerngroß 1928), es ist dies aber wohl eine Blaufluoreszenz.

Die Untersuchung soll in einer weiteren Arbeit auch auf andere *Cirsium*-Arten ausgedehnt werden. Als ein besonders günstiges Objekt zum Studium der Zellsaftmischung gibt Gieckhorn (1929: 373) die Hochblätter des Blütenstandes von *Cirsium oleraceum* an: Bei Plasmolyse mit geeigneten Zuckerkonzentrationen tritt im farblosen Zellsaft ein „Haufwerk“ hell glänzender Kügelchen auf, die zu immer größeren Kugeln zusammenfließen. Von einem Kristallinischwerden dieser Tropfen berichtet Gieckhorn nichts und auch wir sahen in der Epidermis der Blätter dieser *Cirsium*-Art keine Sphäritbildung.

Die Tropfen und Sphärite in den Epidermiszellen von *Cirsium arvense* verschwinden unter Rotviolett-färbung in α -Naphthol-Schwefelsäure; dies könnte dafür sprechen, daß sie doch aus Inulin bestehen, jedoch kommt nur eine diffuse Färbung zustande. Kalzium-Phosphat-Sphärite dürften es auch nicht sein, da sie sich in konzentrierter Salpetersäure nicht lösen (Kohl 1889). In optischer Hinsicht entsprechen die *Cirsium*-Sphärokristalle nicht denen des Inulins, da sie zwischen gekreuzten Nikols zwar beide das dunkle Kreuz, aber nicht mit gleicher Orientierung der Achsen zeigen (Abb. 4). Morphologisch ähnlich sind die Sphärite von *Cirsium* mit Hesperidinkristallen (Pfeffer 1874)³, doch lösen sie sich in Ammoniak nicht mit gelber Farbe.

³ Die Bildung von Hesperidinsphäriten hat Pfeffer bei Zusatz von Alkohol oder Glycerin in Fruchtzellen von *Citrus*-Arten beobachtet. Die außerordentliche



Abb. 4. a) Inulin-Sphärokristall aus *Dahlia*.
b) Sphärokristall aus *Cirsium*. Interferenzfarben im polarisierten Licht.

Es gibt allerdings auch viele „Hesperidin-ähnliche Stoffe“ (Tunmann-Rosenthaler 1931: 62) mit anderen Löslichkeitsverhältnissen. Die *Cirsium*-Gebilde verschwinden in 5% Eisenchloridlösung nach vorhergehender grau-grüner Verfärbung. In heißem Wasser sind sie nicht löslich. Tunmann (1910, 1931) hat auf die Schwierigkeiten der eindeutigen Identifizierung von Inulin-Sphäriten hingewiesen. Über das Vorkommen von Kalzium-Phosphat-Sphäroiden in lebenden Zellen hat Zimmermann (1890: 311) berichtet. Es wäre von Interesse, ob auch solche Sphärite aus Zellsaft-Koazervat-Tropfen entstehen. Es scheint dies möglich zu sein, denn Hansen (1888: 105) hat über die Art, wie diese zustande kommen, folgendes ausgesagt: „In der Tat entstehen die Sphäritkristalle als Tropfen. Wirkt der Alkohol schnell ein, wie dies bei den mikroskopischen Schnitten der Fall ist, so entstehen unzählige kleine Tropfen wie bei einer Emulsion. Beim langsamen Eindringen des Alkohols findet in den Zellen die Bildung von wenigen großen Tropfen statt. Das Festwerden der Sphärokristalle ist ein einfacher Kristallisations-prozeß.“

Die Frage nach der chemischen Natur der *Cirsium*-Sphärite steht jedenfalls noch offen; darüber soll nach weiteren Untersuchungen später berichtet werden. In dieser Mitteilung sollte ja vor allem die Frage aufgeworfen werden, ob Entmischung (Koazervation) des Zellsaftes für die Entstehung von Sphärokristallen von Bedeutung sein kann⁴; für die Bildungen in den kranken *Cirsium*-Blättern in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Pflanze scheint dies so zu sein, dagegen gehen in den Epidermiszellen der gesunden Blätter die Koazervattropfen offenbar nicht unmittelbar in Sphärite über, diese bilden sich vielmehr in großer Zahl erst nach dem Schwinden der experimentell hervorgerufenen Tropfen.

Zusammenfassung

In den Epidermiszellen des Laubblattes von *Cirsium arvense* können in der Vakuole Sphärite entstehen. Sie bilden sich, nachdem vorher im Zellsaft durch Entmischung Koazervattropfen auftreten. Die Entmischung des Zellsaftes erfolgt in den Epidermiszellen kranker Blätter „von selbst“, in denen gesunder Blätter erst bei Alteration verschiedener Art.

Die *Cirsium*-Sphärite sind doppelbrechend und zeigen eine intensive rote Eigenfluoreszenz. Mit Akridinorange vital fluorochromiert, fluoresziert der Zellsaft im sauren Bereich intensiv grün, die Koazervattropfen sowie die Sphärite dagegen fluoreszieren leuchtend rot.

Die chemische Natur der Sphärite steht noch nicht fest, möglicherweise sind es hesperidinähnliche Stoffe.

Menge dieser Kristalle scheint ihm schon ein Beweis zu sein, daß das Hesperidin nicht im Protoplasma, sondern im Zellsaft (ursprünglich gelöst) vorkommt. Man kann, wie wir sahen, das Auftreten der Hesperidinkristalle an Blatt-Epidermis-Schnitten von *Citrus Limonia* schon im Wasser erzielen. Auch in diesem Falle treten zuerst in großer Zahl Entmischungskugeln auf.

⁴ Auf die Vorstellung, die Wieler über die Bildung von Sphäriten entwickelt hat, sei nur verwiesen.

In plasmolysierten Parenchymzellen der *Dahlia*-Knolle wandelt sich der ganze inulinreiche Tonoplast in situ in eine Sphäritkugel um, und zwar erst post mortem des Protoplasten.

Literatur

- Boerner-Patzelt, 1950: Über ursächliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz. Protoplasma 39.
- Bokorny, 1889: Über Aggregation. Jahrb. wiss. Bot. 20.
- Bungenberg de Jong, 1932: Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie. Protoplasma 15.
- 1936: La coacervation. Act. scient. et industr. Paris.
- Fischer, 1898: Über das Inulin, sein Verhalten außerhalb und innerhalb der Pflanze. Beitr. Biol. Pflanzen 8.
- Gicklhorn, 1929: Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung. Kolloidchem. Beih. 28.
- Grafe und Vouk, 1912: Untersuchungen über den Inulin-Stoffwechsel bei *Cichorium Intubus* II. Biochem. Z. 47.
- Hansen, 1888: Über Sphärokristalle. Arb. bot. Inst. Würzburg 3.
- Hegi, 1936: Illustrierte Flora von Mittel-Europa. 2. Aufl. München.
- Höfler, Töth und Luhan, 1950: Beruht die Fluorochromfärbung von Zellkernen auf Elektroadsorption an der Eiweißphase? Protoplasma 39.
- Köhler, 1932: Uredinales (Rostpilze). Sorauer: Handb. Pflanzenkrankheiten. 5. Aufl. 3/2. Berlin.
- Kohl, 1889: Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze. Marburg.
- Kraus, 1877: Das Inulin-Vorkommen außerhalb der Kompositen. Bot. Ztg. 35.
- Küster, 1935: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Leitgeb, 1887: Über die durch Alkohol in *Dahlia*-Knollen hervorgerufenen Ausscheidungen. Bot. Ztg. 45.
- 1888: Die Sphärite. Mitteil. botan. Inst. Graz 2.
- Loew und Bokorny, 1892: Zur Chemie der Proteosomen. Flora 76, Erg.-Band.
- Molisch, 1923: Mikrochemie der Pflanze. Jena.
- Pfeffer, 1874: Hesperidin, ein Bestandteil einiger Hesperideen. Bot. Ztg. 32.
- Pringsheim und Krüger, 1932: Inulin. Klein: Handb. Pflanzenanalyse II/1.
- Strugger, 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover.
- Tunmann-Rosenthaler, 1931: Pflanzenmikrochemie. 2. Aufl. Berlin.
- Vries, de, 1877: Untersuchungen über die mechanischen Ursachen der Zellstreckung, ausgehend von der Einwirkung von Salzlösungen auf den Turgor wachsender Pflanzenzellen. Leipzig.
- Wehmer, Thies und Hadders, 1932: Systematische Verbreitung und Vorkommen von Inulin, Glykogen und Stärke. Klein: Handb. Pflanzenanalyse II/1. Wien.
- Wieler, 1935: Über Sphärite. Kolloid-Zeitschr. 70.
- 1945: Der feinere Bau der Aleuronkörner und ihre Entstehung. Protoplasma 38.
- Zimmermann, 1893: Über Calciumphosphat-Ausscheidungen in lebenden Zellen. Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle 1. Tübingen.

Osmoseverhalten und Nekroseformen von *Euglena*

Von

Karl Höfler und Luise Höfler, Wien

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 10. Juli 1951)

1. Einleitung

Die Euglenaceen nehmen unter den Protisten eine Sonderstellung ein. Sie sind grün und autotroph und ernähren sich also nach Art der Pflanzen. Sie haben keine eigentliche Zellwand; Plasmolyse, d. h. Loslösung des lebenden Protoplasmas von der umgebenden Membran (der Pellicula) durch wasserentziehende Mittel gelingt unter keinen Umständen. An Stelle der rings von Plasma umschlossenen, den Turgordruck bedingenden Vakuole der lebenden Pflanzenzelle findet sich nur eine große, durch einen Kanal (Membrantrichter) nach außen mündende „Hauptvakuole“ (= „Reservoir“), an welche eine oder mehrere kleine, pulsierende „Nebenvakuolen“ grenzen, die ihren Inhalt in gewissem Rhythmus in die Hauptvakuole ergießen. Die osmotische Organisation von *Euglena* entspricht also mehr derjenigen tierischer Protisten (vgl. z. B. Doflein-Reichenow, S. 167).

Seit der grundlegenden Untersuchung von Klebs (1883, vgl. S. 248–250), die in der neueren plasmaphysiologischen Literatur die ihr gebührende Beachtung wohl noch kaum gefunden hat, ist über die osmotischen Eigenschaften bei *Euglena* verhältnismäßig wenig gearbeitet worden. Yasuda (1899) berichtet, daß *Euglena viridis* noch Lösungen von 15% (0,43 mol) Rohrzucker oder 2,4% (0,24 n) KNO_3 aushält. Pierre Dangeard (1924, S. 297, 1928) hat durch Vitalfärbung mit Neutralrot und Cresylblau gezeigt, daß außer den am vorderen Zellende lokalisierten pulsierenden Vakuolen bei *Euglena* zahlreiche kleine, unter $2\ \mu$ große Vakuolen im Plasma eingebettet sind, die somit für den osmotischen Austausch in Betracht kommen.

Bezüglich des reichen speziellen Schrifttums über die Eugleninen sei auf Senn (1900), P. A. Dangeard (1902), Lemmermann (1910), Mainx (1928) und auf die jüngste zusammenfassende Darstellung bei Fritsch (1948) verwiesen.

Formwechsel und Metabolie der Zellen sind bekanntlich von Art zu Art kennzeichnend verschieden. Darüber liegen zahlreiche Beobachtungen vor. Mainx (1928), der zwölf *Euglena*-Arten in Reinkultur zog, hat den Formwechsel bei Kultur auf Agaroberflächen und in Nährlösungen eingehend beschrieben. Nach seinen Erfahrungen ruft allgemein ein plötzlicher Wechsel der Außenbedingungen Änderungen der Zellform hervor, während auch starke Veränderungen gewisser Milieufaktoren spurlos vorübergehen, wenn sie ganz allmählich erfolgen (l. c. S. 388).

Mainx betont mit Recht, daß bei *Euglena* Schwimmform und Ruheform bzw. palmelloide Formen gleichberechtigte Entwicklungszustände sind und daß letztere nicht mit „Enzystierung“ und mit durch Nahrungsmangel hervorgerufenen Depressionszuständen verwechselt werden dürfen.

Wie schon Dujardin (1841), Stein (1878), Klebs (1883, 1893) feststellen, werden die metabolischen Bewegungen durch eine kontraktile Schicht wandständigen Protoplasmas ausgeführt. Als „Periplast“ (Klebs 1893, S. 272) wird in der neueren Literatur (Fritsch 1948, S. 12, 91, 725) die mehr oder minder feste Zellumhüllung einerseits metaboler, andererseits nicht formveränderlicher Zellen beschrieben. Der Periplast „is distinguished from a cell-wall by the fact that it normally divides with the protoplast“. In diesem Sinn umfaßt der Periplast von *Euglena* Pellicula und kontraktile Wandplasmasschicht.

Die phototaktischen Bewegungen bei *Euglena* sind aufs eingehendste untersucht worden (Jennings 1910, Oltmanns 1917 u. a.) und sind bestens bekannt. Negative Geotaxis ist für *Euglena gracilis* von Schwarz (1885) nachgewiesen, negative Osmotaxis wird für dieselbe Art erwähnt. Negative Photokinese hat Bolte (1920) für verschiedene Flagellaten, auch für die Eugleninen *Phacus* und *Lepocinclis* angegeben. Sie kommt sicher auch bei Euglenen vor; doch sahen Ternetz (1912), Pringsheim (1912) und Mainx (1927) in Kulturen von *E. gracilis* die Schwimmfähigkeit im Dunklen fast unbegrenzt erhalten bleiben. Sorgfältige Untersuchungen über Wanderungen und Formwechsel einer *Euglena* (*deses*?) an einem in der Gezeitenzone liegenden, periodisch überschwemmten Flußufer hat Bracher (1919) angestellt.

Jüngst konnte Edmund Weber galvanotaktische Bewegung, welche die Zelle zum negativen Pol führt, für *Euglena olivacea* nachweisen.

Wir haben in den Sommern 1938 und 1940 in dem von A. Pascher gegründeten biologischen Laboratorium der Kurstadt Franzensbad eine größere Versuchsreihe mit einer im Mineralmoor der Soos häufigen, großen *Euglena* sp.¹ durchgeführt. Es war dies eine Form, die durch ihre Salzresistenz für osmotische Studien besonders geeignet erschien und die uns auch, wohl erstmalig, gewisse Erscheinungen der Erholung und des Wiederprallwerdens der Zellen in den Salzlösungen beobachten ließ, die auf der Durchlässigkeit des Periplasten für Salze beruhen dürften und Schlüsse auf die Permeabilität zuließen. Wir hatten Herrn Prof. Pascher, der 1940 zu kurzem Besuch in Franzensbad weilte, einige entscheidende Anregungen zu danken; doch ist jene Versuchsreihe bisher unveröffentlicht geblieben.

Im April 1945 ergab sich die Gelegenheit, die Untersuchung neu aufzunehmen. In Weihern und Gräben am Studentenwald südlich von Bayreuth trat eine *Euglena*, die wohl zu *viridis*, var. *olivacea* Klebs zu stellen ist, in Massenv egetation auf. Sie sei im weiteren als *Euglena olivacea*² bezeichnet. Nach dem ungewöhnlich

¹ Wie uns Prof. A. Pascher damals mitgeteilt hat, handelt es sich um eine unbestimmte und wahrscheinlich nicht beschriebene Art. — Die Algen des Soosmoors sind von Legler (1939) und Brabez (1941) eingehend bearbeitet worden.

² *Euglena viridis*, var. *olivacea* Klebs scheint mehrere Formen zu umfassen. Schmitz (1884, S. 32) hat die *E. olivacea* zur Art erhoben, doch bemerkt schon Dangeard (1902, S. 44), daß Schmitz' Beschreibung mit der von Klebs nicht übereinstimmt. Lemmermann (1910) führt demgemäß die Beschreibungen von *E. viridis*, var. *olivacea* Klebs und *E. olivacea* Schmitz nebeneinander an.

Euglena olivacea ist schlanker als echte *E. viridis*. Unsere Form ist in Schwimmstellung 60–70 μ lang und 11,5–14 μ breit, also fünfmal so lang wie breit; das stimmt mit den Maßen von Schmitz: 68 μ lang, 14 μ breit, gut überein. Die Chromato-

warmen und sonnigen April 1945 war diese *Euglena* zu solcher Masse entwickelt, daß ihre Zellen, zu geeigneter Tageszeit beobachtet, das Wasser oft grün färbten und aller Uferschlamm und Auftrieb von dichten grünen oder dunkelgrünen gallertigen Krusten des Flagellaten, der jetzt alle andere Vegetation erstickte, bedeckt war. Abgeschabte Teile der Euglenendecke wurden in Fläschchen mit Teichwasser überschichtet und dunkel eingebracht; alle Zellen kamen so in Schwimmbewegung. Gleiche Schlammdecken, ohne Befeuchtung untersucht, lieferten ruhende Zellen, von denen sich bald viele im Beobachtungstropfen streckten und zu schwimmen anfangen. Wenn schwimmendes Material am Licht gehalten wurde und die Zellen sich zur Ruhe setzten, bildeten sich oft vielschichtige Kahmhäute an der Wasseroberfläche, und solches Material war dann viel schwerer wieder zur aktiven Bewegung zu erwecken. Die annähernd kugeligen Ruhezellen dienten uns gelegentlich zu Versuchen, worin wir sie mit gestreckten, schwimmenden Euglenen verglichen. An Glaswänden emporgestiegene Euglenen zeigten in Licht Ruhestellung ähnlicher Form, doch waren hier tote, eingetrocknete Zellen beigemischt.

Die Algen wurden von dem kaum 1 km von unserer Arbeitsstätte entfernten Standort am Morgen der Versuchstage eingebracht.

2. Verhalten der Zellen bei osmotischem Wasserentzug

Wir gingen daran, das Verhalten der Art bei Behandlung mit osmotisch wasserentziehenden Lösungen zu studieren. Die Anwendung von Salzlösungen, wie sie bei *Euglena* sp. aus dem Mineralmoor Soos bei Franzensbad verwandt worden waren, erschien der Süßwasserform gegenüber bedenklich. Als Osmotika wurden daher Traubenzuckerlösungen abgestufter Konzentration verwendet. Die volumnormale Stammlösung von 2 mol wurde im Meßkolben mit dest. H₂O aufgefüllt, die Verdünnung mit filtriertem Standortwasser vorgenommen. Das silikat- und tonreiche Wasser wird dabei etwas verdünnt, was aber sicher unbedenklich ist, da ähnliche Verdünnungen bei jedem Regen erfolgen. Die Herstellung der Stammlösung mit H₂O und jeweilige Verdünnung mit Originalwasser empfiehlt sich, da die Zuckerlösungen im Teichwasser nicht lange haltbar sind. Die Zuckerlösung wurde entweder unter gestütztem Deckglas zufließen gelassen oder einem kleinen, den Raum unter dem Deckglas nicht ausfüllenden Tropfen mit Euglenen zugesetzt (vgl. die bei Huber und Höfler 1930, S. 359, beschriebene „Eiltechnik“). Wo genauere Konzentrationen verwendet werden sollten, brachten wir kleine Mengen des Algenmaterials in große Tropfen der Lösung ein, was aber doch eine unkontrollierbare Verdünnung der Untersuchungsflüssigkeit zur Folge hat. Quantitativ läßt sich arbeiten, wenn man mit Hilfe zweier Mikropipetten 1 : 100 cm³

phoren von *E. olivacea* haben zum Unterschied von *E. viridis* mehr minder deutliche Pyrenojde. Ferner fiel uns die lang und farblos ausgezogene Schwanzspitze gegenüber typischer *E. viridis* auf. Sie findet sich übrigens auch bei Dangeards *E. viridis*, var. *olivacea* wieder. *Euglena viridis* steht uns in Wien alljährlich im Frühjahr zur Verfügung. Von der Bayreuther Form, mit der wir 1945 arbeiteten, liegen uns Photos oder Dauerpräparate nicht vor. Wir müssen uns daher die nähere Kennzeichnung unserer Versuchspflanze innerhalb des Verwandtschaftskreises von *E. olivacea-viridis* noch vorbehalten.

entsprechende Volumina des euglenenhaltigen Wassers mit der Stammlösung verdünnt oder besser mit einer durch Mischung derselben mit Standortwasser angefertigten Ausgangslösung von 1 mol Traubenzucker; eine Lösung von 0,4 mol wird derart durch Mischen von 0,8 cm³ molarer Zuckerlösung mit 1,2 cm³ Euglenenwasser hergestellt.

Wir brachten bewegliches Euglenenmaterial in Traubenzuckerlösungen von verschiedener Konzentration. Die Reaktion der schwimmenden Zellen auf den osmotischen Schock bietet ein ungemein anziehendes Schauspiel. Es erfolgt keine Plasmolyse wie bei zellwandumkleideten Algen, dafür aber eine ihr entsprechende Volumverkleinerung des ganzen Zelleibes. Diese ist bei den Euglenen indes mit mannigfachen aktiven Formveränderungen



Abb. 1. *Euglena* sp. (Soosmoor), in 0,6 mol Traubenzucker in gestreckter Stellung erstarrt, lebend.

der Zellen verknüpft. Die Formreaktionen sind, wie es scheint, bei unserer *E. olivacea* Klebs mannigfacher als bei *E. deses* und bei typischer *E. viridis* Ehrbg.

In 0,40, 0,50 oder 0,60 mol Traubenzucker eingebracht, verschmälern sich die meisten schwimmenden Zellen (Abb. 1). Die Anschwellung in der Mitte verschwindet, die Zellen werden linear. Das Schwanzende bleibt dabei meist spitz ausgezogen. Viele andere Zellen zeigen eine typische Verkürzung und Zusammenkrampfung, die im folgenden als „osmotischer Schock“ bezeichnet werden soll. Die Zellen verkürzen sich dabei bedeutend, zeigen oft vorübergehend im Mittelteil eine starke Anschwellung und krümmen sich in mannigfacher Art schraubig ein (Abb. 2), wobei schräg über den Zelleib verlaufende Falten besonders im Mittelteil der Zellen erscheinen. Solche eingekrampfte Zellen sind von denen, die normalerweise in Wasser zur Ruhe gelangt sind, deutlich verschieden. Es scheint sich um eine Reizreaktion, d. h. um eine aktive Antwort der Zelle auf den osmotischen Impuls zu handeln. Die Wasserabgabe der Zellen, die solcher Formänderung vorangeht oder sie begleitet, ist groß, das Volum erscheint stark vermindert. Oft sehen aus der schrauben- oder kreiselartig zusammengekrümmten grünen Zelle das den roten Augenfleck tragende „Köpfchen“ und das stumpfer gewordene verkürzte „Schwänzchen“ als mehr minder farblose Fortsätze her-

vor. Sehr oft ist aus der ovalen oder stumpf dreieckigen Körpermasse nur das kurze Köpfchen vorgestreckt. Die Zellen ruhen eine Zeitlang noch nicht völlig, sondern zeigen langsame amöboide Formänderungen, die durchaus den Charakter des Gezwungenen, Krampfartigen tragen. Doch bleiben solche osmotisch verkrampfte Zellen grundsätzlich befähigt, sich nachher in reinem Wasser wieder auszudehnen und zur normalen Schwimmbewegung zurückzukehren.

Nach einiger Zeit gelangen in den mittleren Konzentrationen (0,5 bis 0,7 mol) alle Zellen zur Ruhe oder die meisten „erstarren“ und nur ein kleiner Prozentsatz behält die aktive Schwimmbewegung zunächst noch bei. Die gestreckten Zellen sind aber dann stark abgeflacht; saugt man Flüssigkeit durch das Präparat, so kommen sie in rollende Bewegung, wobei die je nach der Konzentration verschieden weit vorgeschrittene Abplattung deutlich

sichtbar wird. Es überrascht zu sehen, daß solche durch Abflachung deformierte Zellen, die bandförmig, nicht wie normal im Querschnitt kreisförmig, sind, doch noch aktiv schwimmen und ihre Geißel bewegen können. Später fehlen die Geißeln oft. Man sieht an solchen Zellen dann an Stelle der normalen raschen Vorwärtsbewegung bloß ein ganz langsames Kriechen, das den Organismus kaum mehr vom Platz rücken läßt. Solange die



Abb. 2. *Euglena* sp. (Soosmoor), in 0,4 n NaCl schraubig kontrahiert, lebend.

Geißel vorhanden ist, erfolgt meist noch ein rasches Hinundherzittern des Köpfchens. Ist jene abgeworfen, so kriecht die Zelle in der hypertonen Zuckerlösung nur mehr langsam und geradlinig vorwärts.

Es möge die Beschreibung einiger Einzelversuche folgen, die in der Zeit vom 21. April bis 18. Mai 1945 angestellt wurden. Bis zum 5. Mai war die Witterung kühl, am 8. bis 18. Mai herrschte warmes Sommerwetter (T um $21-25^{\circ}\text{C}$), entsprechend war der Ablauf der osmotischen Vorgänge und physiologischen Wirkungen etwas rascher.

Versuchsreihe 85, Versuch 99: Alle Zellen in Schwimmbewegung. Am 14. Mai um 13.30 Uhr mit 0,6 mol Traubenzucker unmittelbar versetzt („Eiltechnik“). Schon nach $\frac{1}{4}$ Minute hört die Schwimmbewegung auf. Doch bleiben die Zellen beweglich und zur Formänderung fähig. Nach 1 Minute kontrahieren sich viele Zellen, nach 2 Minuten sind etwa zwei Drittel der Zellen in Krampfstellung, zumeist in Kreiselstellung (ähnlich Abb. 2); ein Drittel ist noch gestreckt. Nach 3 Minuten ist die Verschmälerung dieser Zellen deutlich geworden. Die Hauptvakuolen treten überall deutlich hervor. Auch die kontrahierten, verkrampften Zellen sind aber noch amöboid beweglich. Nach 4–5 Minuten sind die Hauptvakuolen schon stark angeschwollen. Nach 6 Minuten ist mehr als die Hälfte der Zellen bewegungslos und die gestreckt gebliebenen sind größtenteils stark verflacht. Nach 8 Minuten ist alles erstarrt. Die Auszählung beginnt. Von den in sechs Gesichtsfeldern (600fach) sichtbaren Zellen sind:

| | |
|--|----------|
| gestreckt, bloß verschmälert | 9 (8%) |
| gestreckt, dabei verflacht und gedreht | 39 (35%) |
| kontrahiert | 64 (57%) |

Nach 14 Minuten schwingen im Präparat ganz vereinzelte Zellen ($< 1\%$) noch mit der Geißel, sonst ist, wie in den ausgezählten Gesichtsfeldern, alles starr.

Versuch 49: 25. April 1945. Euglenenmaterial aus zuvor verdunkeltem Fläschchen. Gestreckt, in Schwimmstellung. Um 11.30 Uhr fließt 0,6 mol Traubenzuckerlösung langsam zu, wobei die Konzentration im Präparat allmählich ansteigt. — Nach

1 Minute schwimmen die Euglenen noch oder sie kleben mit dem Schwänzchen fest und stellen sich auf.

1½ Minuten: Die Schwimmbewegung hält an,

2 Minuten: sie wird langsamer. Eine gestreckte Zelle wird zur Beobachtung gewählt.

2½ Minuten: Sie klebt mit dem Ende fest und wackelt mit dem Köpfchen.

3 Minuten: Sie rührt sich noch; viele Zellen ringsum sind schon starr.

4½ Minuten: Die Hauptvakuole ist mit verschärfter Kontur hervorgetreten.

5 Minuten: Die Zelle beginnt das Köpfchen einzuziehen,

6 Minuten: sie bewegt sich immer noch,

7 Minuten: sie erstarrt; auch ringsum rühren sich weder die gestreckten noch die kontrahierten Individuen mehr.

9 Minuten: Die stark vergrößerte Vakuole in einer gestreckt gebliebenen Zelle mißt $9,2 \times 8,5 \mu$.

Versuch 78: 2. Mai 1945. Ruhende *Euglena* um 17.50 Uhr in 0,6 mol Traubenzucker eingetragen. Die von Anbeginn runden Zellen schrumpfen. Die Vakuolen werden vielfach bald sehr groß: Nach 2½ Minuten mißt eine $8,7 \mu$ im Durchmesser. Nach 5 Minuten sind sie allgemein hervorgetreten. — Neben dem Haufen ruhender Zellen bewegen sich einige in gedrunken gestreckter Stellung. Diese sind nach 6–8 Minuten stark verschmälert, alle ruhenden sind eingeknickt und knitterig oder so stark verflacht, daß die Hauptvakuolen, die ganze Zelldicke einnehmend, sich in der Aufsicht als weiße Kreise oder Ellipsen (z. B. $9 \times 7 \mu$) vom grünen Grund abheben.

Versuch 91: 12. Mai 1945. 11.30 Uhr bewegliches Material in 0,6 mol Traubenzucker eingetragen und ab 11.30½ Uhr beobachtet. Bewegung verlangsamt. Zellen aber nach 1 Minute noch in Schwimmstellung, z. B. 15μ breit. In der 2. Minute verflachen sie. Nach 2 Minuten werden die Vakuolen breiter, nach 3 Minuten messen sie in einer bereits erstarrten Zelle $9,2 \times 8,7 \mu$ (pathologisch vergrößert!), in einer noch kriechenden $7,4 \times 6,9 \mu$. Nach 4½ Minuten sind die meisten Zellen starr, in einer noch langsam kriechenden ist die Vakuole $8,1 \times 7,4 \mu$ groß. Die Vakuolen treten weiß hervor. Schon nach 5½ Minuten ist alles starr. In drei Gesichtsfeldern sind 20 Zellen gestreckt und erstarrt, 39 kontrahiert und verkrampft. Weiter folgt keine Veränderung.

Gut vergleichbar mit Versuch 99 (S. 80) ist der mit gleichem Material am 14. Mai angestellte

Versuch 100 in 0,30 mol Traubenzucker. Nach der 1. Minute kontrahieren sich ebenfalls viele Zellen, aber nur in leichterem Grad. Oft erscheint nur ein stark aufgetriebener Wulst um die Zellmitte. Eine gestreckt gebliebene Zelle ist nach 1½ Minuten noch $10,9 \mu$ breit, nach 2½ Minuten nur noch $9,2 \mu$ breit. Sie bleibt gerade, bewegt das Köpfchen noch leicht. Nach 4 Minuten ist etwa die Hälfte der Zellen gestreckt (und zum Teil leicht verflacht), die Hälfte osmotisch kontrahiert. Nach 5½ Minuten kriechen die gestreckten noch, die kontrahierten sind schwach amöboid beweglich oder größtenteils unbeweglich. Von den gestreckten rührt

sich nach $8\frac{1}{2}$ Minuten etwa noch ein Drittel. Auch ganz flach gewordene „flunderförmige“ Zellen bewegen sich noch. Die kontrahierten sind nach 8–10 Minuten zu meist bewegungslos, nur ganz vereinzelte bewegen sich noch ganz schwach amöboid. Die Hauptvakuole ist in $0,3$ mol meist klein geblieben, nur in einzelnen verflachten Zellen ist sie breiter (bis $9,2\mu$) geworden. Nach 15 Minuten kriechen am Rand des Tropfens mehrere Zellen langsam und ganz wenige schwingen noch mit der Geißel. Nach 25–30 Minuten sind die meisten Zellen starr, es herrscht aber nicht wie in $0,60$ mol vollständige Ruhe, sondern einige Zellen schwimmen in gestrecktem oder verflachtem Zustande und etliche stark kontrahierte drehen sich am Fleck lebhaft im Kreis. Sie machen z. B. in 1 Sekunde eine Drehung um 360° . Dann und wann überschlagen sie sich. Solche Zellen haben trotz der osmotisch verkrampften Form ihre aktiv bewegliche Geißel behalten. Auch sonst gibt es nach 30 Minuten wieder mehr bewegliche Zellen als nach 15 Minuten.

Versuch 50. 25. April 1945. Auch in diesem früheren Versuch waren in $0,30$ mol Traubenzucker nach 30–35 Minuten wieder viele Zellen beweglich. Einzelne lebhaft schwimmende Zellen sind doch deutlich abgeplattet. Das Material verblieb, in dunkler feuchter Kammer, in $0,30$ mol Traubenzucker: Nach 24 Stunden ruhte fast alles und spiralige, verkrampfte Formen herrschten vor. Nur eine Zelle im Präparat schwamm noch. Nach 9 Tagen lebten die Zellen, die roten Augenflecke waren intakt, viele Zellen waren annähernd kugelig und $19,5$ – 23μ breit und sie enthielten jetzt sehr viel Paramylum in Form großer Körner, die sich im Dunkeln in der Zuckerlösung gebildet hatten³.

Der folgende Versuch 59a–i vergleicht die Wirkung verschiedener Konzentrationen. Das Material wurde am 27. April um 8 Uhr eingesammelt, die Lösungsreihe aus 2 mol Traubenzucker und frischem filtriertem Standortwasser hergestellt. Das gut bewegliche Material wurde um 11.56–11.57 Uhr in $0,1$, $0,2$, $0,3$ mol, um 12.14 Uhr in $0,4$, $0,5$, $0,6$ mol und um 13.24 Uhr in $0,7$, $1,0$ und $1,2$ mol Traubenzucker eingetragen; dabei mußte eine leichte Verdünnung um 5% (–10%?) der angegebenen Konzentrationen in Kauf genommen werden.

In $0,1$ mol Traubenzucker blieben die Zellen beweglich und ein großer Teil zeigte, einseitig belichtet, normale Phototaxis.

In $0,2$ mol bewegten sich nach 12 Minuten manche Individuen und kamen vorwärts, die Mehrzahl war osmotisch leicht kontrahiert. Nach 70 Minuten schwimmen unter 150 Zellen noch 20, 125 ruhen und sind kugelig oder oval, nur 3 Zellen sind tot.

In $0,3$ mol ist die osmotische Wirkung deutlich. Nach 5 Minuten bewegen sich die meisten Zellen langsam oder sitzen mit dem Hinterende fest und vibrieren mit dem Köpfchen. Viele sind halbkontrahiert, etliche davon zeigen vergrößerte Hauptvakuolen. Nach 9 Minuten beobachtet, ist der größte Teil der Individuen um die Mitte deutlich osmotisch kontrahiert.

In $0,4$ mol ist die Wirkung wesentlich verschärft, nach 10–12 Minuten sind viele Zellen gestreckt und verschmälert; sie „wollen schwimmen“, manche kommen noch langsam vorwärts mit einer Geschwindigkeit von $1\frac{1}{2}$ bis höchstens $2\frac{1}{2}\mu$ pro Sekunde. Einzelne haben ihre Geißeln noch und wackeln mit dem Vorderende. Die Minderzahl der Individuen ist osmotisch verkrampft, aber auch nach 19 Minuten bewegen sich alle Zellen noch irgendwie. Die Hauptvakuolen sind sichtbar, aber klein geblieben, meist oval, nicht über 7μ lang. Nach 34 Minuten ist die Mehrzahl der Zellen kreisel- oder schraubenartig verkrampft. Gestreckt gebliebene bewegen sich noch ganz langsam.

³ Über Paramylumbildung aus organischen Substanzen im Dunkeln vgl. zumal Mainx, 1927, S. 582 f.

In 0,5 mol sind die Zellen nach 6 Minuten groÙenteils noch langsam beweglich. Viele sind gestreckt und verflacht. Keine dreht sich mehr um die Längsachse. Etliche zeigen aber noch die kreisende Bewegung in Mondstellung mit bauchig vorgewölbter Innenflanke, ähnlich wie sie eingangs für normale, aus der Ruhe erwachende Zellen beschrieben wurde. Nach 8 Minuten sind die Vakuolen vielfach stärker vergrößert als in 0,4, oval, um 9μ breit. Eine beobachtete Zelle verkürzt und verflacht sich nach 11 Minuten. Fast alle stehen jetzt still und kommen nicht mehr vom Fleck. Nach 27 Minuten sind die gestreckten Zellen stark verflacht, bloß 2 Zellen im Präparat wackeln und rücken noch vorwärts (Höchstgeschwindigkeit 6μ pro Sekunde); in ihnen ist die Hauptvakuole mittelgroß geblieben ($8 \times 5,8\mu$).

In 0,6 mol stehen schon nach $1\frac{1}{2}$ –3 Minuten viele Zellen fest oder sie drehen sich langsam im Kreis. Viele sind gestreckt geblieben. Nach 20 Minuten bewegen sich die gestreckten zum Teil, kommen aber fast nicht oder gar nicht mehr vom Fleck. Die meisten sind stark osmotisch verschmälert.

Nach 40 Minuten erfolgt die im folgenden wiedergegebene Auszählung. Reichlich die Hälfte der Zellen ist jetzt osmotisch verkrampft, der kleinere Teil ist gestreckt geblieben. Ganz wenige davon kriechen noch langsam.

Bei der folgenden Auszählung der Typen unterschieden wir normal schwimmende, — kugelig oder oval ruhende, — gestreckte, langsam oder nicht mehr bewegliche, — osmotisch verkrampfte Zellen und schließlich tote bis mandelförmig entspannte (vgl. S. 97).

Euglena olivacea, osmotische Resistenz.

| Mol Traubenzucker | 0,2 | | 0,4 | | | 0,6 | | | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
|---|--------|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|-----|-----|
| Lebend: | | | | | | | | | | | |
| Schwimmend . . | 9 | 11 | 3 | 2 | — | — | — | — | 14% | 3% | — |
| Gestreckt, langsam beweglich oder unbeweglich . . | | | 11 | 9 | 12 | 25 | 21 | 16 | — | 17% | 34% |
| Ruhend, kugelig oder oval . . . | ca. 90 | 35 | | | | | | | 84% | | |
| Osmotisch ver- krampft | | | 30 | 44 | 66 | 34 | 27 | 23 | — | 73% | 46% |
| Tot: | | | | | | | | | | | |
| Entspannt, kugel- bis mandelförmig usw. | — | 3 | 3 | 4 | 6 | 13 | 14 | 10 | 2% | 7% | 20% |

In 0,7 mol stehen schon nach $1\frac{1}{2}$ –2 Minuten die Zellen still oder sie kriechen nur noch langsam. Manche kontrahieren sich und verkrampfen eben. Bald erstarren alle Zellen. Nach 1 Stunde rührt sich nichts. Etwa ein Drittel der Individuen ist in gestreckter, zwei Drittel sind in osmotisch verkrampfter Stellung zur Ruhe gekommen.

In 1,0 mol erfolgt die Reaktion etwas rascher, doch ähnlich.

In 1,2 mol wurde nach 4–6 Minuten beobachtet: Die meisten Zellen sind starr. Die Hauptvakuole ist zumeist schon groß (z. B. $9 \times 7\mu$). Viele gestreckte Zellen sind stark flach gedrückt mit spiralig verlaufenden Falten, wenige kriechen noch trotz starker Verschmälnerung. In einer solchen schwillt nach 8 Minuten die Hauptvakuole auf $10,4 \times 7\mu$ an und zugleich hört die Bewegung auf. Nach 1 Stunde rührt sich nichts mehr. Etwa die Hälfte der Zellen ist in langgestreckter Stellung (z. B. $73 \times 8,5\mu$), die Hälfte in osmotisch verkrampfter Stellung erstarzt. —

Auch nach 2–3½ Stunden gibt es bis in 0,5 mol noch kriechende und in 0,4 mol noch ganz vereinzelte bewegliche Zellen. Von 0,5 mol aufwärts ist die osmotische Erstarrung allgemein erfolgt.

Phototaktische Reaktion der Zellen hat im Reihenversuch nur in 0,1 mol Traubenzucker stattgefunden.

Von besonderem Interesse ist das Schicksal der Hauptvakuole während der osmotischen Wasserentziehung. Darüber hat bereits Klebs die ersten wichtigen Beobachtungen mitgeteilt. Wir hatten die Vorgänge bei *Euglena sp.* aus dem Soosmoor ausführlich verfolgt (Abb. 3). Reagiert unsere *E. olivacea* auch minder einheitlich, so ließ sich doch bei einem großen Hundertsatz der Zellen die Grunderscheinung wiederfinden: während die Zelle schrumpft und an Volumen abnimmt, erfährt die Hauptvakuole eine deutliche Volumvergrößerung. Dabei treten ihre Wandungen mit verschärfter Kontur hervor und die Umrisse werden elliptisch oder kreisförmig⁴. Es



Abb. 3. *Euglena sp.* (Soosmoor), seit 10 Minuten in 0,5 n NaCl. Hauptvakuole (= Reservoir) mächtig angeschwollen. Zelle lebt.

handelt sich um eine verstärkte Oberflächenspannung und Rundungstendenz, wie sie auch von den Tonoplasten typischer Pflanzenzellen her bekannt ist. Der zunächst aparte Gegensatz im Verhalten des schrumpfenden Zelleibes und der anschwellenden Hauptvakuole erklärt sich wohl so, daß von außen durch den Einführungskanal osmotisch wirksame Lösung in die Hauptvakuole eindringt, die nun ihrerseits dem übrigen Zelleib osmotisch Wasser entzieht und dabei anschwillt.

Es ist nun eine auffällige und gerade im Vergleich mit der halobionten Franzensbader Form markante Erscheinung, daß bei unserer Süßwasserart die Veränderung der Hauptvakuole im Diosmotikum auf zweierlei Art erfolgen kann: in manchen Zellen schwillt die Vakuole zu enormer Größe an. Die Mehrzahl der Zellen läßt dagegen so starke pathologische Veränderungen im Hypertonikum nicht erscheinen, sondern die Vakuolen schwellen zwar etwas an, treten optisch mit verschärften Konturen hervor, runden

⁴ Gicklhorn (1921, S. 128) hat Vergrößerung und verschärfte Konturierung der Hauptvakuole von Euglenen durch Behandlung mit Tannin + Glycerin (1 : 4) erzielt.

sich, werden aber doch nicht größer als etwa 7(–8) μ . Über die Konzentrationsabhängigkeit der Vakuolenschwellung gibt der oben mitgeteilte Versuch schon einigen Aufschluß.

Oft fällt das Aufhören der aktiven Bewegung der Zellen in den Zuckerlösungen mit dem Anschwellen der Hauptvakuole zeitlich zusammen.

3. Reversibilität

Wir haben im weiteren vor allem der Frage nach der Reversibilität der beschriebenen osmotischen Wirkungen unsere Aufmerksamkeit zugewandt.

Nach 10–15 Minuten sind in den Konzentrationen von 0,6 bis 1,0 mol Traubenzucker praktisch alle Zellen erstarrt. Wird nun durch solche Präparate neuerlich Standortwasser durchgesaugt, so schwellen die meisten Zellen wieder langsam osmotisch an. Ihre Beweglichkeit erlangen sie dabei fürs erste nicht wieder. Wir übertrugen ein durch 9 Minuten in 0,6 mol Traubenzucker behandeltes Euglenenmaterial, das zur völligen Erstarrung gekommen war, von der Zuckerlösung in reines Wasser und hielten es über Nacht in der feuchten Kammer verwahrt. Am nächsten Vormittag fanden wir zu unserem Erstaunen die meisten Zellen wieder voll beweglich und den Großteil von ihnen am Lichttrand des Präparates angesammelt. Daraus geht hervor, daß der starke osmotische Wasserentzug, der alle Zellen zur Erstarrung gebracht hat, doch von den Euglenen schadlos ertragen wird. Die gestreckten, schwimmenden Zellen unterschieden sich in nichts von unbehandelten Kontrollen.

Die Beobachtung veranlaßte uns, die osmotische Resistenz von *Euglena olivacea* planmäßig zu untersuchen. In der eingangs beschriebenen Weise wurden mit filtriertem Standortwasser wieder Lösungsreihen von 0,1 bis 1,6 mol Traubenzucker angefertigt und einerseits bewegliche, andererseits ruhende, abgekugelte Euglenen für etwa 15 Minuten darein gebracht. Dann wurde durch reichliches und wiederholtes Nachsaugen von Standortwasser der Zucker entfernt. Die Euglenen waren so reich in jedem Tropfen vorhanden, daß der Verlust durch weggespülte Zellen nicht ins Gewicht fiel. Die Versuche wurden am späteren Nachmittag eingeleitet, die Präparate reihen über Nacht in feuchter Kammer gehalten, am Morgen einseitiger Belichtung ausgesetzt und nach einigen Stunden durchmustert.

Versuch 60 und 61. 27./28. April 1945.

a) Bewegliches (am Lichttrand großer Tropfen gesammeltes) und b) ruhendes (in Lichtstellung abgekugelter) Euglenenmaterial am 27. April, 17.30 bis 18 Uhr, für etwa je 15 Minuten in die Traubenzucker-Lösungsreihe eingebracht. Präparate dann durch Durchsaugen frischen filtrierten Standortwassers gründlich ausgewaschen, über Nacht in dunkler feuchter Kammer, am 28. April, 7.20 Uhr einseitigem Licht ausgesetzt, 9 bis 12.30 Uhr untersucht.

Aus 0,2 mol Traubenzucker: Im Präparat a) um 9.05 Uhr die meisten Zellen schwimmend, wenige in Igelstellung, die Geißeln bewegen sich; in b) schwimmen manche, die meisten ruhen in unregelmäßig kugeliger, ovaler oder birnförmiger Stellung, Pyrenoide deutlich, alles lebt.

Aus 0,3 mol: alles lebt, Pyrenoide auch in den ruhenden Zellen deutlich.

Aus 0,4 mol: alles lebt, Zellform in a) größtenteils etwa kugelig, in b) oval bis annähernd (nie mathematisch) kugelig. Pyrenoide überall schön. — Vakuolen klein und undeutlich (ausnahmsweise ist in a) in einer junggeteilten, $25 \times 21 \mu$ großen Zelle die Hauptvakuole noch groß, $10,4 \mu$ breit, sie erscheint farblos auf grünem Grund).

Aus 0,5 mol: Bild ähnlich; in a) viel gestreckte schwimmende Zellen, die ruhenden unregelmäßig oval oder tränenförmig, nicht kugelig. Pyrenoide sehr deutlich. Kreisel- oder spiralförmige Zwangsformen haben sich in Wasser nicht erhalten. In b) auch viel gestreckt-bewegliche Zellen, viel ruhende, diese meist annähernd kugelig.

Aus 0,6 mol: die Zellen leben. In a) etwa ein Drittel bis zur Hälfte in Bewegung, etwa die Hälfte bis zwei Drittel ruhend und hier größtenteils noch osmotisch verkrampft. In einer solchen Zelle wurde das Erwachen der Bewegung im Lichtkegel des Mikroskops beobachtet. Die Zelle schwimmt schließlich (nach 120 Minuten) weg, ist aber nicht „turgescenz“. Phototaktische Ansammlung der Euglenen am Lichttrand in den am Vorabend in 0,2–0,6 mol behandelten Präparaten überall sehr deutlich. — In b) ist die überwiegende Mehrzahl der Zellen in Ruhestellung verblieben.

Aus 0,7 mol: alles lebt, Zellen zum Teil beweglich, zum Teil ruhend. In a) haben auch osmotisch verkrampfte Formen noch gute Pyrenoide. Auch noch schwache phototaktische Ansammlung.

Aus 0,8 mol: in a) schwimmen manche Zellen, die anderen ruhen, sie sind mehr minder osmotisch kontrahiert und größtenteils lebend. Augenfleck erhalten, Zellen aber verhältnismäßig klein, z. B. 28μ lang, 16μ breit. Die Hauptvakuolen meist in Wasser wieder klein und undeutlich geworden, in ganz vereinzelt groß geblieben, z. B. $15,9 \times 12 \mu$ in einer $25 \times 20,8 \mu$ großen Zelle. Ein kleiner Teil der Zellen ist tot. — In Präparat b) zeigt etwa ein Drittel bis zur Hälfte der Zellen Bewegung irgendwelcher Art. Die anderen ruhen. Die lebenden ruhenden sind nie genau kugelig! Es lebt praktisch alles. Die Resistenz ist also im Material b) noch etwas besser als in a).

Aus 0,9 mol: etwa 10% der Zellen bewegen sich in gestreckter Schwimmstellung. Sie erscheinen normal. Die ruhenden Zellen leben zum guten Teil. Im Lichtkegel des Mikroskops rollen sich manche Kugeln auf, kleben anfangs mit dem Hinterende an der Unterlage fest, dann beginnt die Drehung um die Längsachse.

Aus 1,0 mol: etwa 10% der Zellen in Bewegung, die anderen ruhen. Von den bewegungslosen ist hier aber der größere Teil tot: die Augenflecke sind verschwunden, die Plastiden sind vielfach schollig degeneriert. Die Form dieser Zellen ist entweder prall kugelig bis oval oder zweispitzig, oval mit stumpfem Spitzchen usw. — Die Auszählung zweier Gesichtsfelder (300fach) ergab: 17 lebende bewegliche, 14 lebende ruhende, 47 tote Zellen.

Aus 1,20 mol: Im Präparat a) schwimmen um 9.25 Uhr 1–2% der Zellen in gestreckter Stellung, von den übrigen ist die Mehrzahl tot. Diese Zellen sind vielfach genau kugelig, um $21\text{--}23 \mu$ breit, ohne Augenfleck, mit scharf sichtbaren Paramylumkörnern. Oder manche sind oval, entspannt und groß, z. B. $23 \times 29 \mu$, andere sind mandelförmig usw. Degenerierende Zellen haben braune Tröpfchen an Stelle des roten Augenflecks. Lebende Zellen, mit Augenfleck, setzen da und dort die amöboide Bewegung fort, manche erscheinen teilweise rückgedehnt, einige sind in Wasser klein geblieben, manche von diesen haben die riesige Hauptvakuole erhalten (in einer $23 \times 18 \mu$ großen Zelle mißt die ovale Hauptvakuole $16 \times 13,8 \mu$).

Im Präparat b) schwimmen auch wenige Zellen, die ruhenden sind meist kugelig, zum kleineren Teil lebend, zum größeren tot. Die lebenden haben unveränderten roten Augenfleck, intaktes Chlorophyll, noch kenntliche

Pyrenoide und undeutliche, nicht scharf gezeichnete Paramylumkörner. Die toten sind größer, haben keinen Augenfleck mehr oder bloß braune Reste davon, die Chloroplasten sind geballt und lassen farblose Lücken zwischen sich frei; Paramylumkörner sind scharf gezeichnet.

Um 12.20 Uhr wurde nochmals untersucht. Lebenszustand wie früher. Um die ruhenden Zellhaufen haben sich nun doch Hunderte von Zellen in Bewegung gesetzt. In einem Gesichtsfeld schwimmen 9 unter etwa 140 Zellen. Vom unbeweglich gebliebenen Rest ist die überwiegende Mehrzahl tot.

Zum folgenden Reversibilitäts-Versuch 69 (29./30. April 1945) wurde Euglenenmaterial verwendet, das vorher durchwegs beweglich war und dann 5 Stunden am Licht gestanden hatte; hier hatten sich die meisten Zellen zu dichter, vielschichtiger Kahlhaut an der Wasseroberfläche gesammelt. Um 18 Uhr wurden Stücke davon für etwa 15 Minuten in die großen Tropfen der Zuckerlösung verteilt. Der Zucker wurde dabei so wenig verdünnt, daß die Konzentrationen als quantitativ gelten können. Nachher wurde, wie in der früheren Reihe, mit Standortswasser gut ausgewaschen, am folgenden Morgen kamen die Präparate um 8.45 Uhr ans Licht, um 9.45 bis 13 Uhr wurde untersucht.

Aus 0,60 mol Traubenzucker: alles lebt. Etwa 5% der Zellen schwimmen, 95% klumpig zusammengezogen, schwach amöboid oder unbeweglich, verhältnismäßig klein geblieben, z. B. $21 \times 16 \mu$; manche Zellen schwingen die Geißel und zittern mit dem Köpfchen.

Aus 0,80 mol: annähernd die Hälfte der Zellen lebend, der Rest tot. Die lebenden in gestreckter oder in „mondförmiger“ Stellung oder klumpig wie in 0,6. Die toten Zellen erscheinen entspannt. Es gibt unter ihnen viele breite, gestreckte „Schneckenformen“ (vgl. Abb. 5 f, S. 97). Solche gestreckte, aber tote Formen fehlen in 0,6 völlig.

Aus 1,00 mol: etwa ein Viertel der Zellen lebt, drei Viertel sind tot. Etliche lebende schwimmen normal, sie sind „turgeszente“, haben etwa normale Größe. Von den toten sind hier viele in gestreckter Stellung erstarrt; sie sind „schlank“ geblieben und viel kleiner an Volumen als die lebenden; eine ist 76μ lang, linear und nur $10,5 \mu$ breit, eine andere 67μ lang und allmählich nach hinten verschmälert. Nie sind die Zellen breiter in der Hinterhälfte, wie normale es sind. Andere tote sind tränen-, schnecken-, mandelförmig, elliptisch usw. (vgl. Abb. 5, S. 97). Nur 1 tote (ovale) Zelle hat die riesige Hauptvakuole im Wasser beibehalten, sie ist in Abb. 5 d wiedergegeben (Zelle $41,6 \times 24,7 \mu$, die kreisrunde Vakuole $20,8 \mu$ breit). Sonst fehlt die Vakuole in toten Zellen. — Lebende und tote Zellen sind bei der Auszählung schon an der Größe deutlich zu unterscheiden: die lebenden sind wesentlich kleiner (z. B. $27,7 \times 19,2 \mu$).

Aus 1,2 mol: meist tot, doch leben einige Prozent der Zellen; am Rand der großen Zellhaufen schwimmen manche normal.

Aus 1,40 mol: meist tot, etwa 2% der Zellen leben aber und schwimmen normal oder bewegen sich in kontrahiertem Zustand langsam amöboid.

Aus 1,60 mol: so gut wie alles tot. Bei der Durchsicht des ganzen Präparates findet sich unter Tausenden Individuen nur etwa ein Dutzend lebender Zellen. Die toten sind tränen-, mandelförmig, oval oder kugelig.

Bis in 0,7 mol Traubenzucker verläuft die osmotische Schrumpfung reversibel. Die Zellen erwachen nachher in Wasser wieder zu normalem Leben. Bei 0,8–0,9 mol liegt die osmotische Resistenzschwelle, wo etwa die Hälfte der Individuen überlebt, die Hälfte getötet wird. Zieht man in

Betracht, daß schon bei den niederen Konzentrationen von 0,5 bis 0,7 mol alle Zellen osmotisch erstarren, so erscheint diese Schwelle hoch.

Es ist nun außerordentlich bezeichnend, daß diese Resistenzgrenze niemals das Verhalten aller Individuen derselben Proben kennzeichnet, sondern daß stets in Konzentrationen, worin die meisten Zellen getötet werden, ein kleiner Hundertsatz der Individuen noch überlebt und im Wasser die aktiven Schwimmbewegungen wieder aufzunehmen imstande ist. Während die Resistenzgrenze von *Euglena olivacea*, nach dem Verhalten der Mehrzahl der Zellen beurteilt, etwa bei 0,80–0,90 mol liegt und schon bei 1,0 mol die Mehrzahl, bei 1,20 die meisten Zellen getötet sind, bleiben einzelne Individuen bis in 1,40, ja bis in 1,60 mol am Leben.

Das langsame Wiedererwachen der Zellen, die mit hohen Konzentrationen behandelt worden sind, bietet ein anziehendes Schauspiel. Entweder nehmen in den Haufen, wo die meisten getötet sind, einzelne am Leben gebliebene kugelige Zellen die Bewegung wieder auf, treiben die Köpfchen vor, strecken sich und suchen dann zwischen den toten Nachbarn den Weg ins Freie, oder osmotisch kontrahiert gebliebene Zellen gewinnen langsamer und unter krampfhaft erscheinender amöboider Formveränderung und rhythmischer Streckung und Verkürzung ihre Beweglichkeit wieder.

In den Reihenversuchen fällt auf, daß die Zellen, die aus den niederen Zuckerkonzentrationen in Wasser zurückgeführt werden, alle wieder zum vollen Anfangsvolumen anschwellen, während die Zellen aus den höheren zum Teil lange klein bleiben oder nur in verzögertem Tempo wieder „turgescenz“ werden. In Versuch 60 liegt in dieser Hinsicht zwischen 0,5 und 0,6 mol eine deutliche Scheide. Auch nach vielstündigem Wässern sind in den aus 0,6 mol und den höheren Konzentrationen kommenden Präparaten viele Zellen noch „klein“ und osmotisch verkrampft geblieben; während im allgemeinen die Zellen zuerst anschwellen und dann erst wieder bewegtlich werden, können jene Zellen, wie aus zahlreichen Einzelbeobachtungen hervorgeht, auch in geschrumpftem Zustand die Bewegung wieder langsam aufnehmen.

Abb. 4 bezieht sich auf zwei ähnliche Versuche vom 2. Mai 1945. Das Material war um 10.25 Uhr vom Standort eingesammelt, um 11.45 Uhr am Licht in großem offenem Tropfen auf dem Objektträger ausgebreitet worden. Um 12.41 Uhr wurden die am Lichttrand des Tropfens angereicherten Zellen abpipettiert und mit 0,6 mol Traubenzuckerlösung, die frisch aus der Stammlösung von 2,0 mol mit Standortwasser hergestellt worden war, unter gestütztem Deckglas versetzt. Um 12.44 bis 12.45 Uhr wurden die Umrisse der osmotisch verschmälerten, noch ganz langsam schwimmenden Zelle *a* gezeichnet. Um 12.47 Uhr wurde Zelle *b* mit stark vergrößerter Hauptvakuole, um 12.48½ Uhr die schraubig verkrümmte Zelle *c* skizziert; beide Zellen sind bereits unbeweglich. Andere Zellen sind gestreckt und nicht verkrümmt, aber starr und schmal. — Um 13.08 Uhr, d. i. nach 16½ Minuten Aufenthalt im Zucker, wurde Standortwasser durch das Präparat gesaugt. Zwei beobachtete Zellen hatten nach 4 Minuten um 13.12 Uhr noch pralle Vakuolen. Um 13.20 Uhr wurden die wieder breiter gewordenen Zellen *d–f* skizziert.

Zelle *d* war in der Zuckerlösung schmal und gestreckt gewesen, das Anschwellen wurde beobachtet, kurz vor dem Zeichnen hatte sich die Zelle ein wenig verkürzt. Benachbarte Zellen begannen ab 13.33 Uhr sich zu bewegen. — Aus einem Parallelversuch, worin um 13.07 Uhr 0,6 mol Traubenzucker unter Deckglas zugesetzt, aber dann nicht ausgesüßt worden war, wurde nach 58 Minuten die lebende, aber erstarrte Zelle, Abb. 4 *g*, gezeichnet. —

Die zytomorphologische Beschreibung der osmotisch getöteten Zellen und ihrer Nekroseformen soll im vierten Abschnitt folgen. Lebende Zellen

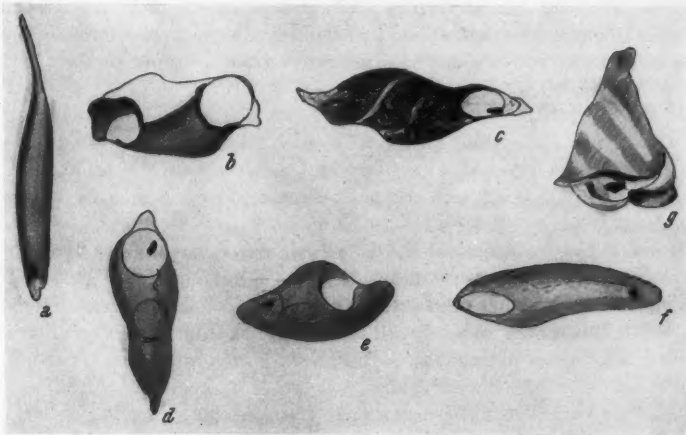


Abb. 4. *Euglena olivacea*, mit 0,6 mol Traubenzucker behandelt. Abb. *a*–*c*, *g* osmotisch kontrahiert, Abb. *d*–*f* in Standortwasser wieder angeschwollen. Vgl. Text, S. 88.

sind, auch wenn sie sich unter Wasseraufnahme wieder gerundet haben und zur Ruhe gelangt sind — und bei Verwendung ruhenden, belichteten Euglenenmaterials herrschen solche Zellen vor —, doch nie mathematisch kugelig, sondern mehr oder weniger unregelmäßig oval oder zumindest stellenweise ein wenig abgeflacht. Sie unterscheiden sich auch dadurch deutlich von den später zu beschreibenden „entspannten“ nekrotischen Zellen.

Unser Euglenenschlamm enthielt oft außer *E. olivacea* als Beimengung eine größere lineare *Euglena* aus der *deses*-Gruppe, vermutlich *E. deses* Ehrbg., die von Ende April an vereinzelt und dann im Mai reichlicher auftrat. In allen Präparaten des Vers. 69 war die Art vorhanden. Sie erwies sich als deutlich resistenter. In 0,8, 1,0, 1,2 mol Traubenzucker lebten und krochen alle, in 1,4 mol die meisten Individuen dieser Form. Erst in 1,6 waren auch die *deses*-Zellen tot und zu länglichen Klümpchen kontrahiert. Ihre Lebensgrenze liegt also zwischen 1,4 und 1,6 mol Traubenzucker. Haben die Schwellenbestimmungen an dieser zweiten Art auch erst orientierenden

Charakter, so läßt sich doch festhalten, daß die osmotische Resistenz für verschiedene *Euglena*-Arten wesentlich verschieden liegt.

In vielen Materialien waren der *E. olivacea* einzelne Diatomeen und später im Mai auch Closterien beigemengt. Stets konnten wir beobachten, daß diese Algen die Behandlung mit 0,6 und 0,7 mol Zucker und das nachherige plötzliche Auswaschen mit Standortwasser nicht vertrugen. Daraus geht hervor, daß die unplasmolysierbaren Euglenen osmotisch wesentlich resistenter sind als Algen, die in den für jene noch völlig unschädlichen Konzentrationen stark plasmolysiert werden; es wirkt zumal die rasche Deplasmolyse in Wasser meist tödlich, während *Euglena* das plötzliche Auswaschen, wie wir sahen, verträgt. Ob sich übrigens nicht auch *Euglena olivacea* höheren Konzentrationen gegenüber als noch resistenter erwiese, wenn sie nachher stufenweise in verdünnere Lösungen und in Wasser rückgeführt würde, bleibt zu untersuchen.

Weitere Reversibilitätsversuche wurden in den Konzentrationen von 0,6 und 0,7 mol Traubenzucker, die bei *Euglena olivacea* lebensunschädlich sind, aber erstarrend wirken, durchgeführt und dabei sowohl die osmotische Erstarrung wie das Wiedererwachen in Wasser fortlaufend mikroskopisch beobachtet.

Grundsätzlich wichtig sind die Veränderungen, die die Hauptvakuole erfährt. Ihr Anschwellen während der osmotischen Schrumpfung der Zellen wurde früher geschildert. In der osmotisch erstarrten lebenden Zelle ist sie meist oder immer prall gerundet, von einer scharf gezeichneten Membran umkleidet und mäßig oder sehr stark angeschwollen. Tritt nun zu solchen Zellen reines Wasser hinzu, so erfolgt nach einigen Minuten eine gegenläufige Veränderung: Die Hauptvakuole schrumpft, verliert ihre prallen Umrisse, wird schlaff elliptisch und nachher oft recht klein. Die Mündung des im vorderen Zellende gelegenen Ausführungsganges wird dabei sehr deutlich sichtbar. Die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs ergibt, daß die prallen Hauptvakuolen im Wasser meist einige Minuten unverändert bleiben und daß dann die Erschlaffung und Verkleinerung recht plötzlich — meist wohl im Laufe einer halben oder einer Minute — erfolgt. Bald nachher erwachen oft die Zellen zur Bewegung. Vergleicht man Zellen, die in gestreckt beweglichem, und solche, die in ruhendem Zustand mit wasserentziehender Zuckerlösung behandelt wurden, so zeigt sich, daß bei ersteren die Vakuolenschrumpfung oft wesentlich früher einsetzt als bei letzteren. Die Vergrößerung der Hauptvakuole während der osmotischen Schrumpfung erfolgt dadurch, daß die von außen in die Vakuole eingedrungene Zuckerlösung aus dem übrigen Zellinhalt Wasser aufnimmt, und ist ein passiver physikalischer Vorgang. Dagegen dürfte die Verkleinerung der Vakuolen nach dem Auswaschen des Osmotikums auf aktivem Auspumpen des Vakuoleninhaltes beruhen und als eine aktive Leistung der Zelle zu werten sein. Über den zeitlichen Verlauf des Prozesses, der diese Deutung bekräftigt, geben die folgenden Protokolle Aufschluß.

Versuch 67. 29. April 1945. Euglenenmaterial, das eine feuchte Kruste auf Schlamm bildet, ohne vorherige Übersichtung mit Wasser untersucht; es enthält

bewegliche und ruhende Zellen. — Um 11.59 Uhr fließt 0,7 mol Traubenzucker zu. Die gestreckten Zellen bleiben meist gestreckt und bewegen sich langsam. Nach 4 Minuten sind die Zellen verflacht, nach 5 Minuten ist ein Drittel noch beweglich. Hier sind die Hauptvakuolen klein (um 5×5 oder $7 \times 5 \mu$). Etwa zwei Drittel sind starr. Hier sind die Hauptvakuolen vergrößert. Die größte in einer osmotisch verkrampften Zelle mißt $15,9 \times 12,7 \mu$. Nach 9 Minuten sind die gestreckten Zellen recht schlank geworden und viele ganz verflacht. In manchen starren Zellen ist die Hauptvakuole recht groß. Nach 15 Minuten ist alles starr; die Hauptvakuole ist überall sehr deutlich, scharf konturiert, teilweise stark geschwollen, vielfach aber nicht größer als etwa $7 \times 7 \mu$.

Nach 18 Minuten wurde mit Standortwasser gründlich durchgewaschen (Präparat durch Deckglassplitter gestützt). Nach $1\frac{1}{2}$ Minuten wurde wieder belichtet. Nach 2 Minuten rührt sich die erste Zelle wieder, nach 3 Minuten wird eine ruhende, gestreckte Zelle mit 9μ großer, runder Hauptvakuole zur Beobachtung gewählt: 5 bis $5\frac{1}{2}$ Minuten nach dem Zutritt des Wassers schrumpft die Hauptvakuole sichtlich, sie verliert ihre Spannung, wird zunächst unregelmäßig oval und ist nach 6 Minuten klein geworden. Gleichzeitig wird vorne am Zellköpfchen die Mündung des Ausführungsganges sichtbar. — Nach 8 Minuten schlagen zwei kleiner gebliebene Nachbarzellen mit den Geißeln, nach 10–11 Minuten sind etliche andere Zellen erwacht und bewegen sich amöboid, nach 12 Minuten hat im Gesichtsfeld nur mehr eine Zelle eine pralle, $8 \times 8 \mu$ große Hauptvakuole. Diese Zelle ist noch unbeweglich und bleibt weitere 6 Minuten lang so. — Nach 100 Minuten lebt und rührt sich alles, rundliche Formen herrschen vor, die Pyrenoide sind deutlich geworden.

Versuch 78. 2. Mai 1945. Ruhendes, abgerundetes Material um 18.07 Uhr in 0,6 mol Traubenzucker eingetragen. Nach $3\frac{1}{2}$ Minuten hat eine geschrumpfte Zelle schon eine große, $8,6 \mu$ breite, runde Hauptvakuole. Nach 5 Minuten sind die Vakuolen auch in den ruhenden, geschrumpften Zellen vergrößert und prall geworden. Verschrämlerung vereinzelter gestreckter Zellen wie sonst, alle ruhend kugeligen eingeknickt und verknittert. In verflachten erscheint die Hauptvakuole weiß auf grünem Grund.

Nach $13\frac{1}{2}$ Minuten wird Standortwasser durchgesaugt. In einer gestreckten, 53μ langen, $10,9 \mu$ breiten Zelle schrumpft die Hauptvakuole $3\frac{1}{2}$ Minuten nach dem Auswässern, nach 4 Minuten rührt sich diese Zelle und nach $4\frac{1}{2}$ Minuten schwimmt sie schnell davon. Nach $5\frac{1}{2}$ Minuten wird eine rundliche Ruhezelle zur Beobachtung eingestellt. Die Hauptvakuole ist groß, kreisförmig, $10,4 \mu$ im Durchmesser. Nach $7\frac{1}{2}$ und nach 11 Minuten ist sie unverändert. Nach $13\frac{1}{2}$ Minuten ist sie etwas kleiner (9μ breit) geworden, nach 17 Minuten wird sie unregelmäßig oval und 1 Minute später ist sie nur mehr $7,2 \mu$ breit. In beweglichen Zellen ringsum ist die Vakuole längst klein, etliche ruhende gehäufte Zellen haben aber noch nach 20 Minuten pralle Hauptvakuolen, obwohl die Zellen selbst schon angeschwollen und wieder turgeszent geworden sind.

Beim zuvor ruhenden *Euglena*-Material erfolgt im Wasser die Verkleinerung der Hauptvakuolen anscheinend langsamer als beim beweglichen.

Versuch 93. 12. Mai 1945. Zu gleichem Material wie in Versuch 91 (S. 81) um 15.15 Uhr 0,6 mol Traubenzucker zugesetzt. Der Verlauf, im einzelnen protokolliert, war ähnlich wie dort. Nach 1 Minute bewegen sich alle Zellen nur mehr amöboid, nach $2\frac{1}{2}$ Minuten treten die Vakuolen deutlich hervor. Die geschrumpften Zellen kontrahieren und dilatieren sich rhythmisch. Der Rhythmus wird langsamer. Nach 4 Minuten hört die amöboide Bewegung bei der Mehrzahl der Zellen auf. Nach 5 Minuten sind die Hauptvakuolen scharf sichtbar. Nach 8 Minuten treten sie allgemein stark hervor. Nach 10–15 Minuten wird eine der plattgedrückten, in

der Mitte schräg überschlagenen Zellen gezeichnet. — Nach 20 Minuten sind unter 25 Zellen des Gesichtsfeldes noch 2 beweglich, nach 25 Minuten hat auch die schwach amöboide Bewegung der kontrahierten Zellen allgemein aufgehört, die Vakuolen sind meist klein geblieben (um 7μ), doch scharf kontrahiert.

Nach 24 Stunden wird Wasser durchgesaugt. Nach 2 Minuten schwimmen 2 Zellen wieder, viel zahlreichere nehmen zunächst die amöboide Bewegung auf, wobei die rhythmische Kontraktion und Ausdehnung dieser Zellen allgemein wahrzunehmen ist. Die Streckung und Zusammenziehung dauert an einer Zelle je 4–5 Sekunden. Nach 8 Minuten sind alle Zellen wieder ziemlich prall („turgeszent“), aber rund, nicht gestreckt, und unbeweglich. 1 Zelle unter 120 ist tot, vergrößert, entspannt, sie ist auf den ersten Blick im Übersichtsbild kenntlich. — Nach 90 Minuten lebt alles, fast alle Zellen sind rundlich elliptisch und in Ruhe, nur 1–2% schwimmen.

Die meisten Euglenenmaterialien, mit denen wir arbeiteten, wurden in gleicher Weise geprüft, so daß die Tatsache der Reversibilität der osmotischen Wirkung von 0,6 und 0,7 mol Traubenzucker völlig gesichert erscheint.

Wir haben schließlich noch die Frage untersucht, wie lange *Euglena olipacea* einen Aufenthalt in der hypertonischen Lösung von 0,6 mol Traubenzucker verträgt. Die Hauptreihe wurde schon bei sommerlich hoher Temperatur (untertags 21–24° C) am 13. bis 15. Mai durchgeführt.

Bestbewegliches, am Lichtrand flacher Tropfen angesammeltes Zellmaterial wurde in frisch mit Standortwasser bereitete Lösung von 0,6 mol Traubenzucker eingebracht und verschieden lange Zeit darin belassen: durch 10, 25, 40 Minuten, 1 Stunde, 1½, 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden. Die osmotische Erstarrung der gestreckt schwimmenden Zellen erfolgte ähnlich wie in den früher mitgeteilten Versuchen. Nach 10 Minuten war alles bewegungslos. Die Präparate waren durch Deckglassplitter gestützt, so daß das Auswaschen gründlich erfolgen konnte. Untersucht wurde kurz nachher, nach 20–30 Minuten und nochmals am folgenden Tag nach 12–18 Stunden. Das Ergebnis war recht klar. Hatte die Zuckerlösung durch 10, 25, 40 oder 60 Minuten eingewirkt, so lebte nachher alles. Viele Zellen hatten sich bei den späteren Revisionen der Präparate am Licht gesammelt. Nach 1½stündiger Behandlung war fast alles am Leben, weniger als 5% tot. Nach 2stündiger lebten etwa drei Viertel der Individuen, ein Viertel war tot, nach 4stündiger Zuckerwirkung waren zwei Drittel lebend, ein Drittel tot. Nach 6stündiger Versuchsdauer war das Bild ähnlich, doch gab die Auszählung eines Gesichtsfeldes 81% lebende und 19% tote Zellen. — Erst in dem 24 Stunden lang mit Zucker behandelten Präparat war deutlich die Mehrzahl der Zellen getötet, ein wesentlicher Teil aber doch auch noch lebendig. Die Auszählung von fünf Gesichtsfeldern bei 600facher Vergrößerung ergab 31% lebender und 69% toter Zellen. Überall läßt sich der Lebenszustand sicher erkennen. Zwar sind die Zellen, die eine lange Zuckerbehandlung hinter sich haben, auch nachher im Wasser meist unbeweglich, doch sieht man bei längerer Beobachtung in vielen der lebenden Zellen im Lichtkegel des Mikroskops ganz langsam amöboide Formänderungen eintreten. — Nach 48stündigem Aufenthalt in 0,6 mol Traubenzucker sind alle Zellen getötet.

Die *Euglena*-Individuen verhielten sich, so wie bei der Prüfung der schäd-

lichen Konzentrationsschwellen, auch bezüglich der Zeitdauer, in der der osmotische Wasserentzug vertragen wird, recht ungleich. Doch ist im angeführten Versuch die Einwirkung von 0,6 mol durch 60 Minuten noch durchwegs unschädlich, nach 90 Minuten sind erst wenige Zellen geschädigt und bei 120 Minuten liegt die Schwelle deutlicher Schädigung. Es ist möglich, daß bei Materialien anderer Herkunft und Stimmung die Zeitresistenzschwellen anders liegen. Im früher angeführten Versuch, wo schon nach 80 Minuten in 0,60 mol ein größerer Prozentsatz getötet war, war das Material wohl nicht so einheitlich gesund, denn es war nicht wie hier durch positiv erfolgte phototaktische Ansammlung selektiert worden.

Harnstoffwirkung. Es lag nicht im Plan der Arbeit, die Wirkung zahlreicher, chemisch verschiedener Osmotika auf *Euglena olivacea* vergleichend zu prüfen. Doch haben wir ein zweites, in der botanischen Zellphysiologie wichtiges Plasmolytikum noch orientierend untersucht, nämlich den Harnstoff. Er erwies sich als völlig unschädlich. Ruhendes Euglenenmaterial, am Abend in 0,3 mol Harnstoff eingebracht, zeigte nach 17 Stunden alle Zellen am Leben, große Haufen rundlicher Zellen waren in Ruhe, die roten Augenflecke intakt, ringsum schwammen viele Zellen in normaler Streckstellung.

Wir prüften die Wirkung halbnormaler Harnstofflösung.

Versuch 72. 1. Mai 1945. *Euglena* am Morgen gesammelt. Am Lichttrand eines offenen Tropfens hatten sich die phototaktisch reagierenden Zellen in dichter Masse angesammelt. Hier mit der Pipette entnommene Proben enthielten lauter gestreckte Zellen.

Um 12.12 Uhr 0,5 mol Harnstoff zugesetzt. Nach $\frac{1}{4}$ Minute beginnt die Beobachtung. Nach 2 Minuten zittern und schrumpfen die Zellen, alle sind noch gestreckt. Nach 3 Minuten erscheinen unter den 20 Zellen des Gesichtsfeldes an zwei die ersten steilen Wülste in der Zellmitte. Nach 5 Minuten ist die Hauptvakuole meist schwach angeschwollen, nur an einer Zelle stark (auf $11,6 \times 10 \mu$) vergrößert; diese Zelle bewegt sich doch noch. Nach einer weiteren $\frac{1}{2}$ Minute stellt sie die Bewegung ein (die ruhende Geißel wird sichtbar), während alle Nachbarn mit noch kleinerer Vakuole noch beweglich sind. Im Laufe der nächsten 2 Minuten kommt die Mehrzahl der Zellen zur Ruhe. Sie sind meist gestreckt geblieben, wenige sind verkürzt. $9\frac{1}{2}$ Minuten nach Zusatz der Harnstofflösung bewegen sich nur mehr wenige Individuen, in denen die Hauptvakuole noch klein (z. B. $4,6 \times 3,5 \mu$) geblieben ist, die meisten sind starr. Nach 11 Minuten ist fast alles unbeweglich, die Vakuolen sind wenigstens mittelgroß ($7 \times 6 \mu$ u. dgl.) geworden und mit scharfen Konturen sichtbar. Nach 12 Minuten bewegt sich unter 58 Zellen nur mehr eine einzige.

Nach 13 Minuten wurde frisches Standortwasser durch das Präparat gesaugt und dann sogleich wieder beobachtet. Die Zellen erwachen sukzessive wieder zur Bewegung, und zwar eher schneller als in den Zuckerversuchen. Bei 600facher Vergrößerung lagen 24 Zellen im Gesichtsfeld. Nach $2\frac{1}{2}$ Minuten beginnt die erste sich zu drehen, die nach $5\frac{1}{2}$ Minuten davonschwimmt. Nach $4\frac{1}{2}$ Minuten beginnt eine zweite, bisher starre, mit der Geißel zu schlagen, nach $5\frac{1}{2}$ Minuten eine dritte. In der nun folgenden Minute erwachen 4 weitere Zellen, in der nächsten 2, in der folgenden 7, dann 3 weitere. Nach $10\frac{1}{2}$ Minuten sind 16 von den 24 Zellen des Gesichtsfeldes erwacht und nur 8 sind noch bewegungslos. 3 davon erwachen in den nächsten $1\frac{1}{2}$ Minuten, 4 in den folgenden 3 Minuten. — Die meisten Zellen ziehen sich nun bald nach dem Erwachen zusammen. Nur wenige schwimmen ab. Nach 16 Minuten

sind 22 Zellen im Gesichtsfeld geblieben, die träge amöboide Bewegung zeigen und sich dabei wenig von der Kugelform entfernen, 3 Zellen sind ab-, eine ist zugeschwommen. Nur 1 Zelle bleibt bewegungslos, sie hat den Augenfleck verloren und ist tot. — Beobachtet man individuelle Zellen vom Moment des Aussüßens an, so wird deutlich, daß die Zellen zuerst anschwellen und dann erst wieder beweglich werden. Nach 32–36 Minuten sind die meisten Zellen (74%) kontrahiert und schwach amöboid beweglich, ein kleinerer Teil (22%) in Mondsichelform kreisend; nur 3 Zellen im Präparat sind tot. Nach 1 Stunde ist das Bild ähnlich geblieben. Die Kürzung und Rundung der Zellen ist also nach der Harnstoffbehandlung die normale Reaktion. — Das Präparat bleibt in feuchter Kammer. Nach 5 Stunden lebt so gut wie alles. Unter 161 ausgezählten Zellen sind 87% annähernd (nicht mathematisch) kugelig, 11% gedrunken gestreckt (z. B. $48 \times 20 \mu$ groß), wobei das Kopfende dicker als das Hinterende ist, und nur 3 Zellen schwimmen in normal gestreckter Stellung.

Nach zweitägigem Aufenthalt in feuchter Dunkelkammer lebt noch alles; wenige Zellen bewegen sich, einseitig dem Licht ausgesetzt, phototaktisch. Diese flott schwimmenden Zellen lassen die Pyrenoide und die darum gesammelten Paramylumkörner besonders scharf erkennen. Die meisten Zellen ruhen, sind intakt, fast kugelig, und etliche Zellen haben normale Zellteilung durchgemacht.

Versuch 71. 1. Mai 1945. Gleiches bewegliches Euglenenmaterial, um 12.17 Uhr mit 0,5 mol Harnstoff versetzt. Formveränderung der Zellen beobachtet. Nach 5 Minuten hat sich eine bestimmte Zelle verflacht, doch bewegt sie sich noch langsam. Nach 9 Minuten ist unter 4 Zellen eine gestreckt ($53 \times 10,4 \mu$ groß), sie schwimmt langsam; 2 Zellen bewegen sich kreiselartig mit aufgetriebener Mitte, eine ist osmotisch verkrampft und bewegt sich langsam amöboid. Überall ist die Hauptvakuole vergrößert. Ihr Ausführungsgang tritt im Harnstoff recht deutlich hervor. — Nach 22–26 Minuten sind die meisten Zellen kontrahiert und die Zellkerne erscheinen etwas aufgequollen. Die Hauptvakuolen sind mäßig stark vergrößert (z. B. $8,1 \times 6,9 \mu$), schwach amöboide Bewegung kommt noch vor. Es gibt auch noch gestreckte Zellen, die mäßig verschmälert sind; sie „kriechen“ mit gleichförmiger Geschwindigkeit (z. B. $2,5 \mu$ pro Sekunde). In einer $60 \times 9,2 \mu$ großen Zelle mißt die gestreckte Hauptvakuole $8,1 \times 4,6 \mu$. — In drei Gesichtsfeldern sind 18 Zellen gestreckt und beweglich, 47 Zellen verkrampft.

Nach 40 Minuten sind die noch beweglichen Zellen recht schlank geworden, z. B. $8,5 \mu$ breit. Der Harnstoff ist also wohl noch nicht in nennenswerter Menge permeiert.

Die wesentlichen osmotischen Erscheinungen verlaufen in den hypertonicen Lösungen von Traubenzucker und Harnstoff, die beide gleich unschädlich sind, in ähnlicher Weise.

Die Permeabilität für Harnstoff zu bestimmen, wurde an *Euglena olivacea* noch nicht versucht. Für Permeabilitätsmessungen erscheint die im Jahre 1940 geprüfte *Euglena sp.* aus dem Mineralmoor Soos, die aber jetzt nicht zugänglich ist, wesentlich besser geeignet.

4. Nekroseformen

Wiederholt war im vorigen Abschnitt von Zellen die Rede, die durch starke osmotische Einwirkungen getötet waren. Als Lebensreaktion kommt Plasmolyse bei *Euglena* nicht in Frage, da die Zellen grundsätzlich unplasmodysierbar sind. Auch Vitalfärbung mit Neutralrot ist zur Unterscheidung von Lebend und Tot nicht ohne weiteres anwendbar. Dennoch gelingt es bei

einiger Kenntnis des Objektes zuverlässig, im mikroskopischen Bild lebende von toten *Euglena*-Zellen zu unterscheiden.

In den Reihenversuchen war von 0,9 mol Traubenzucker aufwärts der Großteil der Zellen getötet und nach dem Durchsaugen reinen Standortwassers nicht mehr zur Bewegung zu erwecken. Wir haben solches Material wiederholt untersucht und bei starker Vergrößerung durchmustert. In 1,2 mol war z. B. der größere Teil getötet, der kleinere noch am Leben. Das bequemste Merkmal zur Erkennung lebender Zellen ist die Erhaltung des roten Augenflecks. Zellen, die trotz der Aussüßung verkrampft geblieben sind oder sich nur teilweise rückgedehnt haben, den Augenfleck aber unverändert erhalten haben, sind noch am Leben; sie lassen bei fortgesetzter Beobachtung im Lichtkegel des Mikroskops meist amöboide Eigenbewegung erkennen. Beim Zelltod verfärbt sich der Augenfleck von Rot nach Braunrot; nach einiger Zeit verschwindet er gänzlich. — Die lebenden Zellen zeigen ferner intakte Chloroplasten und undeutliche, nicht scharf gezeichnete Paramylumkörner. In den toten treten letztere im mikroskopischen Bild verschärft hervor. Die Chloroplasten neigen zur Verkürzung und Abrundung, wobei sie aber die grüne Farbe und scharfe Konturierung zunächst erhalten können. Ein Teil der Zellfläche ist in den nekrotischen Zellen neben den scholligen, rundlichen Chloroplasten farblos ausgespart, wogegen in lebenden Zellen auch bei starker osmotischer Kontraktion des Zelleibes und ebenso beim nachherigen Wiederanschwellen im Wasser meist der ganze Zellinhalt mehr gleichmäßig grün erscheint.

Weitaus das auffälligste Kennzeichen der toten *Euglena olivacea* ist aber der Zellumriß. Die meisten toten Zellen erscheinen entspannt. Während in der lebenden Zelle die kontraktile Wandplasmaschicht die Zellform bestimmt, scheidet diese bei der toten Zelle als aktiver Faktor aus. Die Endform toter Zellen ist demnach die einer mathematischen Kugel; die Kugelform ergibt sich beim Fehlen der aktiven Wandschicht als physikalische Endform der Zelleichen. Möglicherweise ist also die nekrotische Zelle noch zur Wasseraufnahme durch Osmose oder Quellung befähigt; dann wären die prall kugeligen *Euglena*-Zellen dem Mechanismus nach turgeszenten lebenden Pflanzenzellen vergleichbar. Ebensooft haben aber die entspannten, toten Zellen diese Endform nicht erreicht, sondern sie sind scheibenförmig mit kreisrundem Umfang oder ellipsoidisch, eiförmig, mandelförmig, bohnen- oder herzförmig. Die letzteren Formen ergeben sich, wenn das zugespitzte Schwanzende noch andeutungsweise erhalten ist. Wenn bei symmetrischem Umriß die Wölbung an einem Zellpol stärker ist als am anderen, so resultieren eiförmige Formen, bei gleicher Rundung der Pole ellipsoidische. Von tränenförmigen Zellformen läßt sich sprechen, wenn das Zellköpfchen noch als kleiner Höcker erhalten, die Mitte stark verbreitert, das Hinterende zu langer, mehr oder minder rautenförmiger Spitze ausgezogen ist. Überall handelt es sich um halbentspannte Nekroseformen.

Die Entstehung solcher ist wohl begünstigt bei nachträglicher Wasseraufnahme von Zellen, die vor dem Tode osmotisch kontrahiert waren. Vergleicht man in Präparaten, die mit Zuckerkonzentrationen, welche einen Teil

der Zellen töten, vorbehandelt sind, lebende und tote Zellen, so fällt allgemein die viel zartere Konturierung der toten, die derbere der lebenden Zellen auf. Hat man den Blick für diesen Unterschied geschärft, so kann man, auch wo die Eigenbewegung fehlt, schon bei mittlerer Vergrößerung die Erhaltung der kontraktiven Wandplasmaschicht an den schärferen, gleichsam leicht schattierten Zellumrissen erkennen. Die lebenden Zellen sind ferner auch in der Ruhestellung nach dem Wiederanschwellen meist doch nicht genau kugelförmig, sondern mehr minder unregelmäßig oval oder bei runder Gestalt zumindest stellenweise ein bißchen abgeflacht. Auffällig ist meistens auch der Größenunterschied. Die toten Zellen sind größer als die lebenden, was wohl mit dem Verlust der aktivkontraktiven Wandplasmaschicht ursächlich zusammenhängt.

Beachtet man in Reihenversuchen die Verteilung der Nekrosebilder in Zuckerkonzentrationen von 0,80 mol aufwärts, so zeigt sich, daß hier Nekroseformen häufig sind, die wir in den Protokollen als „Schneckennekrosen“ bezeichnen. Die toten *Euglena*-Zellen haben die eine Längsseite flach, die andere gewölbt; die Zellen sind dabei aber gleichmäßig breit oder in der Vorderhälfte breiter und erinnern so an kriechende Nacktschnecken. Sind die Augenflecken noch braun, so bedeutet dies, daß die Zellen erst kürzlich abgestorben sind. Daneben finden sich auch schon unter den toten Zellen in 0,8 mol mandelförmige, tränenförmige und schließlich mathematisch kugelförmige. Zum Unterschied von diesen Formen sind die „Schneckennekrosen“ unsymmetrisch; doch zeigen sie bei Drehung um 90° oft symmetrischen Umriss.

Die in Abb. 5 skizzierten Nekrosen stammen aus einem Präparat, das in 1,0 mol Traubenzucker 15 Minuten behandelt, dann mit Wasser ausgelaugt und 16 Stunden darin belassen worden war (vgl. Vers. 69, S. 87). In Schwimmstellung erstarrte und so abgestorbene Zellen gaben Bilder wie in Abb. 5a, halb kontrahierte, osmotisch verflachte Zellen gaben rocheneiförmige, wie in Abb. 5b. Abb. 5c stammt aus einem in gleicher Weise in 1,20 mol vorbehandelten Material. Nur recht selten sind in abgestorbenen, entspannten Zellen noch tote Hauptvakuolen erhalten wie in Abb. 5d; die Zelle ist 42 μ lang, 25 μ breit, die riesige Hauptvakuole 20,8 μ breit; eine benachbarte lebende ovale Zelle mißt 28 \times 19 μ . Abb. 5e zeigt eine ovale, entspannte, 31,2 \times 25,4 μ große tote Zelle. Im beschriebenen Präparat lebte etwa ein Viertel der Zellen, drei Viertel waren tot. — Die „Schneckennekrose“, Abb. 5f, stammt aus der knapp über der Resistenzschwelle gelegenen Zuckerkonzentration von 0,80 mol (vgl. das Versuchsprotokoll S. 87).

Anhangsweise seien noch einige Nekrosebilder von *Euglena olivacea* kurz erwähnt, die auf andere Weise als durch osmotischen Wasserentzug abgestorben bzw. getötet worden war⁵. Läßt man schwärmendes Material in den Flaschen, von oben belichtet, stehen, so sammeln sich die Euglenen bald zu dichten Kahmhäuten an der Wasseroberfläche, runden sich und ge-

⁵ Auf die zahlreichen, im Schrifttum verstreuten Angaben über Nekrosebilder bei verschiedenen Euglenen können wir hier nicht eingehen.

langen zur Ruhe. Die Kahlhaut scheint die Flüssigkeit von Luftzutritt abzuschließen. Euglenen sind gegen Sauerstoffmangel empfindlich. Nach einigen Tagen sind die Zellen unter der Kahlhaut größtenteils erstickt und nur manche Individuen harren aus und bleiben beweglich. Auch solche Nekrosen sind den beschriebenen ähnlich. Mathematische Kugeln mit zarter Zellhülle und rundlich kontrahierten Chromatophoren (vgl. Fig. 7, Taf. III bei Klebs 1883) sind häufig. Es ist dies die kennzeichnende Nekroseendform der Art. Birn- oder mandelförmige, halbentspannte Zellformen kommen vor, sind aber doch seltener und nicht so typisch ausgebildet wie in den durch hypertonsche Lösung getöteten Präparaten. Nach längerer Zeit verkleben vielfach die klumpigen toten Chloroplasten und alte Zellleichen zeigen bisweilen statt der grünen, prallen Plastiden schwärzliche, ge-

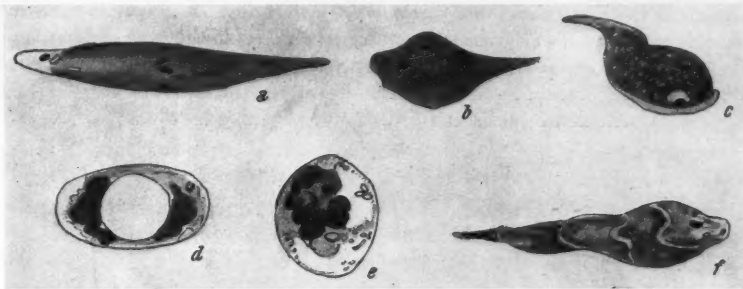


Abb. 5. *Euglena olivacea*. Nekrosen; a—e in 1,0 mol, f in 0,8 mol Traubenzucker abgestorben. Vgl. Text.

schrumpfte, dazu sind die Zellmembranen im späteren Stadium nicht mehr prall, sondern stellenweise eingedrückt und faltig. Bleiben die toten Euglenen im faulenden Medium den Bakterien überlassen, so wird von diesen schließlich die äußere Zellwand (Pellicula) aufgezehrt und nur ein Klümpchen von Paramylumkörnern und Chlorophyllresten bleibt übrig.

Als selteneres Krankheitsbild in alternden Materialien unserer *Euglena* seien schließlich ausgebleichte Zellen erwähnt, die ihr Chlorophyll eingebüßt haben⁶. Sie können auf normale Weise schwimmen, und wenn sie ruhen, sind die Zellumrisse abgerundet. Sie zeigen, im Zellinhalt unregelmäßig verteilt, kleine, glänzende, kastanienbraune Körnchen. Doch fanden sich solche apochlorotische Zellen in den *E. olivacea*-Materialien bei weitem seltener als etwa bei der halobionten *Euglena* sp. aus dem Soosmoor. Auch partieller Chlorophyllverlust ist seltener; in solchen Zellen ist die hintere Zellhälfte farblos und nur die Vorderhälfte von der Hauptvakuole bis etwa zur Zellmitte noch grün. Von farblosen Zellen anderer *Euglena*-Arten (bes.

⁶ E. Weber erhielt jüngst an Kaseinkulturen von *Euglena olivacea*, die im Dunkelschrank gehalten wurden, völlig farblose Individuen dieser Art, die sich nach Überimpfung im Dunkeln bei heterotropher Lebensweise gut vermehrten.

von *E. gracilis*) ist in der Literatur vielfach die Rede (Zumstein 1900, Ternetz 1912, Pringsheim und zumal Mainx 1927, S. 392).

Als seltsames Paradoxon sei schließlich eine zweiköpfige *Euglena*-Zelle erwähnt. Wir beobachteten sie in einer mit 0,8 mol Traubenzucker vorbehandelten Probe, worin nach dem Auswässern fast alle Zellen lebten. In einem Haufen ruhender Zellen nahm etwa ein Drittel der Individuen im Lichtkegel des Mikroskops die Bewegung langsam wieder auf. Die normalen Zellen suchten zwischen den runden, ruhenden ihren Weg ins Freie. Die eine zweiköpfige Zelle war gestreckt lanzettlich und hatte an beiden Polen große Hauptvakuolen und in diagonalsymmetrischer Stellung daneben die zugehörigen roten Augenflecke. Ein Schwanzende fehlte. In rhythmischer Folge kontrahierte sich die Zelle und streckte sich wieder. Wie bei Speemans zweiköpfigem *Molch* schienen die beiden Zellköpfe gegeneinander zu arbeiten. Die Zelle fand ihren Weg ins Freie nicht. Zu erfolgreicher phototaktischer Orientierungsbewegung scheint sie nicht befähigt zu sein. Trotz weiteren Suchens fand sich unter vielen tausend beobachteten Zellen die gleiche Monstrosität nicht wieder. — Vermutlich war die Längsteilung der Zelle durch den osmotischen Schock unterbrochen worden.

5. Rückblick und Besprechung

Bringt man schwimmende *Euglena olivacea* in Traubenzuckerlösungen von 0,4 bis 0,6 mol, so erfahren die Zellen kennzeichnende Formveränderungen. Manche verschmälern sich durch osmotische Wasserabgabe und bleiben langgestreckt, etliche platten sich in gestreckter Lage ab. Viele andere verkürzen sich und krümmen sich schraubig oder kreiselartig ein (vgl. Abb. 1—4). Der zeitliche Verlauf des Formwechsels geht aus den mitgeteilten Protokollen (S. 80—84) hervor. Nach einiger Zeit erstarren die Zellen. — Die Volumabnahme erfolgt passiv und beruht auf osmotischer Wasserentziehung, die krampfartigen Bewegungen aber auf osmotischem Schock, der eine Reizreaktion, d. h. eine aktive Antwort der Zelle auf den osmotischen Impuls ist.

Das Formenspiel beim osmotischen Wasserentzug entspricht in vielen Zügen wohl dem Formwechsel beim natürlichen langsamen Austrocknen der Zellen; dabei treten, Hand in Hand mit der Volumverminderung, ähnliche Krampfformen auf, die bei neuerlichem Wasserzutritt reversibel sind.

Die osmotische Resistenz der geprüften Euglenen ist groß. Saugt man Standortwasser durch Präparate mit in Zuckerlösung erstarrten Euglenen und beläßt sie über Nacht in feuchter Kammer, so sind die Zellen nachher wieder zu normalem Leben erwacht. Man findet am nächsten Tag fast alle Zellen wieder voll beweglich und die meisten sind zu normaler Lichtreaktion befähigt.

In Reihenversuchen mit Traubenzuckerlösungen steigender Konzentration lag für *Euglena olivacea* bei 0,8—0,9 mol die osmotische Resistenzschwelle, wo etwa die Hälfte der Zellen überlebte. Bei 1,0 mol wurde die Mehrzahl, bei 1,2 mol die meisten Zellen getötet. Einzelne Individuen bleiben aber noch in 1,4, vereinzelt sogar bei 1,6 mol am Leben. Die Streuung der

Resistenzgrenzen ist also bei *Euglena* sehr weit, im Gegensatz zu den viel schärferen Schwellen der osmotischen Resistenz, die z. B. von vielen Meeresalgen her (Biebl 1958, 1959) bekannt sind. Ebenso mögen in der Natur, wo Schwellen der Austrocknungsresistenz über den Fortbestand der vegetativen (nicht eingekapselten) Zellen entscheiden, einzelne hochresistente Individuen überleben, wenn das Gros der Zellen einer Population zugrunde geht.

Das Wiedererwachen der zuvor osmotisch erstarrten Zellen wurde verfolgt. Wenn mäßig hypertonische Zuckerkonzentrationen eingewirkt haben, so schwellen nachher im Wasser die Zellen rasch wieder zum vollen Volumen an und werden dann erst wieder beweglich. Aus höheren Konzentrationen (über 0,6 mol) kommende Zellen bleiben viel länger „klein“ und osmotisch verkrampft, wir sahen solche Zellen aber auch in geschrumpftem Zustand die amöboide Bewegung wiederaufnehmen. — Im übrigen liegen die Resistenzschwellen wohl für die einzelnen *Euglena*-Arten recht verschieden, z. B. für *Euglena deses*, wie es scheint, höher als für *E. olivacea*. Wir müssen uns vergleichende Angaben für später vorbehalten.

Auffällig ist im osmotischen Versuch vor allem das Verhalten der Hauptvakuole, des „Reservoirs“ der Zoologen, das bei allen Euglenen wiederkehrt (Abb. 3, S. 84). Jene erfährt, wie schon Klebs als erster beobachtet hat, in hypertonischer Lösung meist eine starke Volumvergrößerung. Die Vakuolenwandung tritt verschärft hervor, ihre Oberflächenspannung und Rundungstendenz nimmt zu. Daß die Tonoplasten der Gewebszellen höherer Pflanzen bei Kappenplasmolyse und Vakuolenkontraktion ähnliche Veränderungen erfahren können, ist wohl bekannt (vgl. z. B. Höfler 1939, Kaiserlehner 1939).

Den Gegensatz im Verhalten der schrumpfenden *Euglena*-Zelle und der anschwellenden Hauptvakuole möchten wir so erklären, daß in letztere von außen durch den Membrantrichter osmotisch wirksame Lösung eindringt, die nun ihrerseits dem übrigen Protoplasten Wasser entzieht und dabei anschwillt. — Klebs (1885, S. 249) hat das Phänomen anders zu erklären versucht. Die Hauptvakuole sei im Hypertonikum unfähig, Wasser nach außen zu schaffen. „Dadurch, daß anfangs die Nebenvakuolen noch entstehen und in sie hineinmünden, vergrößert sie sich; dies ist nur bis zu einem gewissen Grade möglich, da sehr bald das Zytoplasma durch Wassermangel erstarrt. So würde es sich erklären, warum nur lebende Euglenen die Dilatation zeigen und auch nur bei verdünnten Lösungen, da die konzentrierten momentan den Körper zum Erstarren bringen.“ — Daß die Hauptvakuole im Zustand osmotischer Anschwellung kein Wasser mehr auspumpt, steht fest. Doch spricht das relativ rasche, keineswegs stetig erfolgende Anschwellen für unsere Erklärung. Auch hat schon Klebs beobachtet, daß die Nebenvakuolen in der osmotisch geschrumpften Zelle ihre Tätigkeit einstellen. Unsere Deutung wird auch gestützt durch unsere Beobachtungen über das Schicksal der Hauptvakuole beim Wiedererwachen der zuvor osmotisch erstarrten Zellen im Standortwasser. Die vergrößerten prallen Hauptvakuolen bleiben im Wasser meist einige Minuten un-

verändert. Dann schrumpfen sie recht plötzlich, meist im Laufe einer halben oder einer Minute, sie werden schlaff elliptisch und nachher oft recht klein. Dabei wird die Mündung des Membrantrichters oft sehr deutlich sichtbar: die hypertonische Lösung, die nach unserer Auffassung die pralle Hauptvakuole vorher erfüllt hat, wird ausgestoßen. Bald nachher erwacht oft die Zelle zur Bewegung.

Daß die im Osmotikum verschärft sichtbare Membran der Hauptvakuole nachher im Wasser wieder verschwindet, ist vergleichbar der Reversibilität der Tonoplastenbildung. Wäre die Vakuolenwandung von *Euglena* flüssig wie der Tonoplast der Alliumzelle (Chambers und Höfler 1931), so würde auch ohne weiteres verständlich, daß sich in der gesunden Zelle der Inhalt der Nebenvakuolen rhythmisch in die Hauptvakuole ergießen kann. Während die letztere ausgedehnt und von verstärkter Membran umgeben ist, ist, wie erwähnt, die Funktion der Nebenvakuole sistiert.

Während der osmotischen Schrumpfung der *Euglena*-Zelle tritt zweifellos Wasser durch die Zelloberfläche bzw. durch den Periplasten nach außen. Wir müssen aus dem Tempo der Verkleinerung schließen, daß der Periplast für Wasser ziemlich leicht durchlässig ist. Die Wasserpermeabilität ist der Größenordnung nach vergleichbar mit derjenigen langsamer durchlässiger pflanzlicher Plasmen (Huber und Höfler 1930). Der Zucker tritt nicht in osmotisch faßbarer Menge ein. — Während somit infolge der Semipermeabilität des Periplasten alle Zellen im Hypertonikum osmotisch schrumpfen, erfolgt die Schwellung der Hauptvakuole bei *E. olivacea* keineswegs in allen Zellen (bei der von uns 1940 untersuchten halophilen *Euglena* sp. aus dem Soosmoor erfolgt die Vakuolenschwellung noch stärker und allgemeiner). Daß übrigens das der Zelle osmotisch entzogene Wasser seinen Weg nicht etwa allein durch die Hauptvakuole und den Membrantrichter nimmt, wird aus den mitgeteilten Beobachtungen über den zeitlichen Verlauf des Geschehens wohl klar. Das wird besonders deutlich auch beim Wiederturgeszentwerden der Euglenen im Wasser. Das plötzliche Auspumpen des Vakuoleninhaltes stellt nach unserer Meinung eine aktive Leistung der Zelle dar.

Zur Kenntnis des Periplasten von *Euglena*, der die metabolen Bewegungen der Zellen ausführt — der in vergleichend-protoplasmatischer Hinsicht interessantesten Zellorganelle —, haben wir noch wenig beitragen können. Auch die Frage nach der Wasserbilanz des kontraktilen Wandplasma-schlauches während der osmotischen Versuche bleibt zu klären. Doch zeigen die in Abschnitt 4 beschriebenen Nekroseformen, daß tote Zellen entspannt oder halbentspannt sind, daß sie größer als lebende Zellen sind und der mathematischen Kugelform zustreben. Die Zellumrisse der toten Zellen sind zarter, die der lebenden sind derber konturiert. Man kann danach, auch wo Eigenbewegung fehlt, die Erhaltung des Wandplasma-schlauches an den schärferen Zellumrissen erkennen. Eine Loslösung des Protoplasten von der „Pellicula“ kommt bei *Euglena* nur bei toten Zellen vor. Eine solche „Pseudoplasmo-lyse“ ist also hier nicht Lebens-, sondern Todesreaktion. Daß die lebende Euglenaceen-Zelle niemals plasmolysierbar ist, ist seit Klebs bekannt (1883, 1886, S. 403).

Im ganzen gesehen, zeigt die *Euglena*-Zelle eine osmotische Organisation, welche viel mehr der tierischen Protistenzelle als der Algenzelle entspricht. — In den Zellen typischer Süßwasseralgen herrscht ein nach Atmosphären messender Innendruck, der durch die osmotische Saugkraft des Zellsaftes, den Grad der Turgordehnung und den elastischen Gegendruck der gedehnten Zellulosemembran bestimmt ist. Ein Turgordruck des Zellinhaltes auf die Zellumhüllung von ähnlicher Größenordnung ist bei *Euglena* sicher nicht vorhanden. Vom Standpunkt funktioneller Betrachtung möchten wir annehmen, daß die den Eugleninen eigene Fähigkeit zur lebhaft metabolischen Bewegung mit einem solchen Turgor nicht vereinbar wäre. Denn die Metabolie setzt doch voraus, daß der bei der Bewegung aktive Periplast sich nicht im Zustand elastischer Dehnung und Spannung befindet. Sonst würde jede Formveränderung eine stark erhöhte Arbeitsleistung nötig machen.

Wien, Pflanzenphysiologisches Institut.

Literatur

- Biebl, R., 1939: Protoplasmatische Ökologie der Meeresalgen. Ber. D. bot. G. 57, (78).
Bolte, E., 1920: Über die Wirkung von Licht und Kohlensäure auf die Beweglichkeit grüner und farbloser Schwärmzellen. Jahrb. f. wiss. Bot. 59, 287.
Brabez, R. (hgg. von Pascher A.), 1941: Zur Kenntnis der Algenflora des Franzensbader und Sooser Thermenbereiches. Beihefte Bot. Centralbl., Abt. A, 61, 137.
Bracher, R., 1919: Observations on *Euglena deses*. Annal. of Bot. 33, 93.
Chambers, R., and K. Höfler, 1931: Micrurgical studies on the tonoplast of *Allium cepa*. Protoplasma 12, 338.
Dangeard, A. P., 1902: Recherches sur les Eugléniens. Le Botaniste 8.
Dangeard, Pierre, 1924: Le vacuome chez les Eugléniens. Bull. Soc. Bot. France 71, 297.
— 1928: L'appareil mucifère et le vacuome chez les Euglènes. Ann. Protistol. 1, 69.
Doflein, F.-Reichenow, E., 1927/28: Lehrbuch der Protozoenkunde, 5. Aufl. Jena.
Dujardin, F., 1841: Histoire naturelle des Zoophytes. Paris.
Fritsch, F. E., 1948: The structure and reproduction of the algae. Vol. I. Cambridge.
Gicklhorn, J., 1921: Eine einfache Methode zur Darstellung der Geißel mit Basalkorn bei Flagellaten. Zeitschr. wiss. Mikroskopie 38, 123.
Hamburger, C., 1911: Studien über *Euglena Ehrenbergii*, insbesondere über die Körperhülle. Sitzungsber. Akad. Wiss. Heidelberg, math.-nat. Kl. 2, Nr. 4.
Höfler, K., 1941: Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. Protoplasma 33, 545.
— 1943: Über Fettspeicherung und Zuckerpermeabilität einiger Diatomeen usw. Protoplasma 38, 71.
Huber, B., und K. Höfler, 1930: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jahrb. f. wiss. Bot. 73, 351.
Jennings, J., 1910: Das Verhalten der niederen Organismen. Jena.
Kaiserlehner, 1939: Über Kappenplasmolyse und Entmischungsvorgänge im Kappenplasma. Protoplasma 33, 579.
Klebs, G., 1885: Über die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorien. Unters. Bot. Inst. Tübingen 1, 233.
— 1886: Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Ebenda 2, 333.
— 1893: Flagellatenstudien I. u. II. Zeitschr. wiss. Zool. 55, 265 u. 353.

- Legler, F., 1939: Studien über die Ökologie der rezenten und fossilen Diatomeenflora des Egerer-Franzensbader Tertiärbeckens. Beihefte Bot. Centralbl., Abt. A, 59, 1.
- Lemmermann, E., 1910: Kryptogamenflora der Provinz Brandenburg, Bd. III, Algen I.
- 1913: *Eugleninae*. Paschers Süßwasserflora. Heft 2: Flagellatae II.
- Mainx, F., 1927: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen. I. Morphologische Beobachtungen, Methoden und Erfolge der Reinkultur. Arch. f. Protistenkunde 60, 305.
- 1927 b: Desgl. II. Untersuchungen über die Ernährungs- und Reizphysiologie. Ebenda 60, 355.
- Oltmanns, F., 1917: Über Phototaxis. Zeitschr. f. Bot. 9, 257.
- Pringsheim, E. G., 1912: Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 12, 1.
- Schmitz, F., 1884: Beiträge zur Kenntnis der Chromatophoren. Jahrb. f. wiss. Bot. 15, 1.
- Schwarz, F., 1884: Der Einfluß der Schwerkraft auf die Bewegungsrichtung von Chlamydomonas und Euglena. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 2.
- Senn, G., 1900: Flagellata. In Engler u. Prantl, Natürl. Pflanzenfam. I. Teil, Abt. 1 a.
- Stein, F. v., 1878: Der Organismus der Infusionstiere. III. Leipzig.
- Tannreuther, G. W., 1923: Nutrition and reproduction of *Euglena*. Roux Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen 52, 367.
- Ternetz, C., 1912: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. Jahrb. f. wiss. Bot. 51, 435.
- Weber, E., 1950: Monographische Studien über *Euglena olivacea*. Diss. d. philos. Fakultät d. Univ. Wien.
- 1951: Physiologische Untersuchungen an *Euglena olivacea*. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, im Druck.
- Yasuda, A., 1899: Über die Anpassungsfähigkeit einiger Infusorien in konzentrierten Lösungen. Arb. Bot. Inst. Univ. Tokyo.
- Zumstein, H., 1900: Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis*. Jahrb. f. wiss. Bot. 34, 149.

Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht

Von

Annemarie Toth

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

(Eingelangt am 17. Juli 1951)

I. Einleitung

Das Neutralrot nimmt unter den Hellfeld-Vitalfarbstoffen eine bevorzugte Stellung ein. Schon die grundlegenden Untersuchungen Ruhlands (1908) zeigten, daß es als basischer Farbstoff vor allem aus neutralem bis schwach basischem Milieu von den lebenden Zellen besonders rasch aufgenommen wird. In neuerer Zeit befaßten sich Strugger (1935, 1936) und Drawert (1938, 1940) eingehend mit der Analyse der Neutralrot-Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Sie fanden, daß je nach Chemismus und dadurch bedingtem physiologischem Zustand der Zellen das Neutralrot im schwach sauren Milieu bis zu einem gewissen kritischen p_H von der Zellwand, von diesem Bereich ab gegen den Neutralpunkt hin begierig vom Zellsaft gespeichert wird. Daher galt Neutralrot in der Botanik als ausgesprochener Vakuolenfarbstoff. Nachdem Haitinger (1938, S. 94) auf die Verwendbarkeit von Neutralrot als Fluorochrom hingewiesen hatte, unternahm es Strugger (1940), die Neutralrotfärbung pflanzlicher Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen und zu analysieren.

Strugger arbeitete mit gepufferten Neutralrotlösungen 1 : 10 000 (Phosphatpuffer). Als Versuchsmaterial verwendete er die oberen (inneren) Epidermishäutchen von *Allium cepa*. Es standen ihm für seine Versuche nur Frühjahrswiebeln, die ihre Winterruhe bereits aufgegeben hatten, zur Verfügung, bei denen (vgl. Drawert 1938) die Umschlagspunkte Membran-Vakuolenfärbung etwas im stärker sauren Gebiet lagen.

Nach Strugger weist die freie, molekular gelöste Base des Neutralrot in Wasser eine stark orangegelbe Fluoreszenz auf, während in iondispersem Zustand keine Fluoreszenz zu beobachten ist; dies dürfte seiner Meinung nach auch für die Moleküle des Farbsalzes zutreffen. Da der Farbstoff von den Zellmembranen als Kation elektrostatisch adsorbiert, also in ionisierter Form gebunden wird, fluoreszieren die Membranen nur kaum sichtbar dunkelrot in dem Bereich, in dem im Hellfeld sichtbare Membranfärbung stattfindet. Auch unterhalb des IEP konnte die Imbibition der Membransysteme fluoreszenzoptisch gerade noch nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Struggers Versuchen auch für die Vakuolenfärbung. Im Hellfeld ist zwischen p_H 5 und p_H 7 eine Rotfärbung

der Vakuole zu beobachten. Im Fluoreszenzmikroskop ist sie kaum nachzuweisen. Bei Anwendung eines lichtstarken Instrumentes ist ein schwacher, dunkelroter Schimmer gerade noch zu beobachten. Daraus zieht Strugger den Schluß, daß der Farbstoff im Zellsaft normalerweise nicht in molekularer Form gespeichert wird, denn er verhält sich fluoreszenzoptisch so, als ob er in ionisierter Form oder als Farbsalz vorläge.

Strugger fand weiter, daß Zellen, die im Hellfeld keine deutlich sichtbare Neutralrotfärbung der Vakuole besitzen, im UV-Licht doch ein ganz schwaches, graues Leuchten des Zellsaftes zeigen, das sich mit der Annäherung an diejenige c_H , in welcher die Vakuolenfärbung deutlich wird, immer mehr verstärkt. Er nimmt daher an, daß geringe Mengen des Farbstoffes auch im sauren Bereich von der Vakuole aufgenommen werden. Wurden Schnitte, die mit Neutralrot gefärbt waren und im Hellfeld rote Vakuolen mit Vakuolenkontraktion zeigten, längere Zeit im Fluoreszenzmikroskop belassen, so daß ein Teil des Schnittes vom UV-Erregerlicht bestrahlt wurde, zeigten in diesem Schnittteil die vordem fast fluoreszenzfreien, nur äußerst schwach dunkelroten Vakuolen einen interessanten Fluoreszenzwechsel. Sie wurden allmählich graugrün. Dieses Graugrün wurde immer stärker, bis es schließlich in helles Grüngelb überging. Strugger schloß daraus auf eine Veränderung der Fettsäuren, hervorgerufen durch die Bestrahlung mit UV-Licht, und auf ein Übergehen der ionisierten Form des Neutralrot nach UV-Bestrahlung in die molekulare Form.

Anders liegen die Verhältnisse beim Cytoplasma. Durch die Vakuolenkontraktion entstehen in den Zellecken größere Plasmaansammlungen. Dieses Plasma, das im Hellfeld ungefärbt erscheint, leuchtet nun im Fluoreszenzmikroskop stark gelbgrün auf. Damit zeigte Strugger, daß Neutralrot auch für pflanzliche Zellen einen Plasma-Vitalfarbstoff darstellt. Die gelbgrüne Fluoreszenz deutet darauf hin, daß der Farbstoff nicht in ionisierter Form anwesend ist. Aber auch wäßrige Lösung der Farbbase kommt nicht in Betracht, diese müßte ja orangegelb fluoreszieren. Strugger nimmt daher an, daß die Base in neutralen Lipiden im Plasma gelöst ist; seine Annahme wird durch die Tatsache erhärtet, daß auch die nach KNO_3 -Plasmolyse entstehenden Myelinfiguren, die ja eine lipoid Komponente des Plasmas darstellen, stark gelbgrün fluoreszieren.

Die Ergebnisse von Struggers fluoreszenzoptischen Untersuchungen waren kurz zusammengefaßt folgende:

1. Speicherung des Neutralrot als Base in den neutralen Lipiden des Cytoplasmas, wobei deutliche gelbgrüne Fluoreszenz auftritt.
2. Speicherung in ionisierter Form in Membran und Zellsaft. Aus diesem Grunde nur ganz schwache, kaum wahrnehmbare Fluoreszenz.
3. Fluoreszenzwechsel der Vakuolen nach zwei- bis zehnminütiger Bestrahlung mit dem UV-Erregerlicht, die eine Veränderung der Fettsäuren hervorruft.

In der Neuauflage des Praktikums der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze (Strugger 1949) wurde diesen Ergebnissen nichts Neues hinzugefügt. Strugger spricht hier sogar von völliger Fluoreszenzfreiheit der Membranen und Zellsäfte in allen p_H -Stufen.

II. Eigene Untersuchungen

Eines der wichtigsten Ergebnisse von Höflers vergleichenden Vitalfärbungsstudien war die Aufdeckung der Existenz zweier grundsätzlich verschiedener Mechanismen der Zellsaftfärbung (Höfler 1947). Bei seinen Versuchen mit dem Fluorochrom Akridinorange fand er, daß sich die Vakuolen der Blattepidermiszellen von *Orchis maculata* über p_H 6,5 zu stumpf kupferroter Fluoreszenz färben, während sie unter p_H 6,2 völlig ungefärbt erscheinen. Ganz anders verhält sich die Blattepidermis von *Platanthera bifolia*. Hier färben sich die Vakuolen grün, und zwar reicht diese Färbung auch noch weit ins saure Gebiet (bis ungefähr p_H 3).

Auf Grund dieses vitalfärberischen Verhaltens unterscheidet Höfler „leere“ und „volle“ Zellsäfte. Bei den leeren Zellsäften (*Orchis maculata*) erfolgt mit Akridinorange Ionenspeicherung. Die Moleküle des Farbstoffes können durch das Plasma permeieren; da der Zellsaft sauer ist, dissoziieren sie aber und polymerisieren zu Kationenketten. Auf diese Weise bleibt dauernd ein Gefälle für die Moleküle erhalten; die leicht sauren Zellsäfte fungieren als „Ionenfallen“. Bei den vollen Zellsäften (*Platanthera bifolia*) hingegen wird der in die Zelle eindringende basische Farbstoff an in der Vakuole vorhandene Stoffe chemisch gebunden.

Auswaschen der Schnitte mit NH_3 ($n/100$ — $n/500$) bewirkte im Falle der leeren Zellsäfte völlige Entfärbung. NH_3 macht die Zellsäfte alkalisch und verwandelt damit die rot leuchtenden Ionen des Akridinorange in permeierfähige Moleküle, die leicht durch das Plasma exosmieren. Sie werden dann außen von den Zellmembranen elektroadsorptiv mit leuchtend kupferroter Farbe gebunden, während die Zellsäfte völlig entfärbt werden. Die Zellen bleiben dabei am Leben. Die grün fluoreszierenden vollen Zellsäfte werden hingegen mit NH_3 nicht entfärbt, da der chemisch im Zellsaft gebundene Farbstoff nicht zu freien permeierfähigen Basenmolekülen rückverwandelt wird. — Der Farbstoff Neutralrot verhält sich in seiner Wirkung auf volle und leere Zellsäfte ebenso wie Akridinorange. Auch hier ist die Unterscheidung mittels NH_3 -Reaktion möglich.

Seit langem schon ist das verschiedene Verhalten der äußeren und inneren Epidermis von *Allium cepa* nach Anfärben mit Neutralrot bekannt. Es färben sich in beiden Fällen die Vakuolen an, jedoch in verschiedenen Farbtönen. Während die Vakuolen der Innenepidermis erdbeerrot erscheinen, sind die der Außenepidermis mehr violettrot gefärbt. Mit Akridinorange färbt sich die Innenepidermis rot, die Außenepidermis hingegen grün. Wir haben es also hier auch mit leeren (Innenepidermis) und vollen (Außenepidermis) Zellsäften zu tun. Diese leeren und vollen Zellsäfte wurden nun, zunächst an *Allium cepa*, später vergleichsweise auch an verschiedenen anderen Pflanzen, nach Anfärben mit Neutralrot vergleichend fluoreszenzoptisch untersucht.

a) Versuche an *Allium cepa*

Verwendet wurden stets Schnitte aus der Schuppenmitte der dritten Schuppe von außen. Sie wurden zunächst mit H_2O infiltriert und dann für

10 Minuten, in einigen Fällen auch für 20 Minuten in Farbbäder von Neutralrot 1:10 000 in p_H 4,8 und p_H 7,45 (Phosphatpuffer) gebracht. Anschließend wurde im gleichnamigen ungefärbten Puffer ausgewaschen und beobachtet. Gleichzeitig wurden gleichwertige Schnitte auch in eine Akridinorange-Lösung 1:10 000 p_H 7,45 eingelegt, um volle und leere Zellsäfte sicher identifizieren zu können.

Zunächst wurden Außen- und Innenepidermis einer gelben Zwiebel (Zittauer Gelbe) untersucht.

Innenepidermis p_H 7,45: Leere Zellsäfte. Im Hellfeld erscheinen die Vakuolen erdbeerrot gefärbt, die Zellen zeigen gleichmäßige Vakuolenkontraktion. Die Plasmazwikel in den Zellecken sind farblos. Im UV-Licht erscheinen die Vakuolen ungefärbt, das Plasma hingegen leuchtet silbrig bis zart grüngelb, die Membranen erscheinen farblos.

Außenepidermis p_H 7,45: Volle Zellsäfte. Die Vakuolen sind im Hellfeld violettrot gefärbt und zeigen keine Vakuolenkontraktion. Im UV-Licht leuchten die Vakuolen blutrot auf, an einzelnen Stellen erscheinen auch die im allgemeinen farblosen Membranen gelb.

Bei einer weißen Zwiebel (Ägyptische Weiße) hingegen, die bei der Kontrollfärbung mit Akridinorange leere Zellsäfte in der Außenepidermis ergab, zeigten die im Hellfeld erdbeerrot gefärbten Vakuolen im UV-Licht ebenso wie die Vakuolen der leeren Innenepidermis keinerlei Fluoreszenz. Das Plasma hingegen leuchtete silbrig bis grüngelb.

Als dritte Zwiebel wurde eine austreibende gelbe Zwiebel (Zittauer Gelbe) untersucht. Sie zeigte die von Drawert für Hellfeldfarbstoffe beschriebene Mosaikfärbung, die Höfler (1948, S. 607) für Fluoreszenzfarbstoffe als Buntfärbung bezeichnet. Es fanden sich hier in der Innenepidermis im Akridinorange neben roten leeren auch grüne volle Zellsäfte und alle möglichen Farbübergänge, wie Braunrot, Braun, Braungrün, Gelb, Gelbgrün usw. Die Außenepidermis hatte normale volle Zellsäfte. Die mit Neutralrot p_H 7,45 gefärbten Schnitte der Innenepidermis zeigten im Hellfeld neben den erdbeerroten Vakuolen auch violettrote und alle Übergänge zwischen diesen beiden Farben. Im UV-Licht gab es analog dazu neben Vakuolen, die nicht fluoreszierten, solche, die blutrot aufleuchteten und daneben noch in verschiedenen Farbstufen von graurosa über rosa bis rot aufleuchtende Vakuolen. Die im Hellfeld violettrot erscheinenden Vakuolen der Außenepidermis leuchteten auch hier blutrot im UV-Licht.

Die vollen Zellsäfte wurden auch in Neutralrotlösungen von p_H 4,8 gefärbt. Auch hier zeigten die im Hellfeld violettroten Vakuolen schöne Rotfluoreszenz im UV-Licht.

Es zeigten sich wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenz neutralrotgefärbter leerer und voller Zellsäfte. Während leere Zellsäfte im UV-Licht nicht merklich aufleuchten, zeigen die vollen Zellsäfte eine schöne, kräftige Rotfluoreszenz.

Interessante Ergebnisse brachten die Versuche über Fluoreszenzwechsel, die analog den eingangs erwähnten Struggerschen Versuchen durchgeführt

wurden. — Schnitte von der Innenepidermis der gelben Zwiebel, die leere, im UV-Licht nicht rot aufleuchtende Zellsäfte hatten, wurden nach dem Anfärben mit Neutralrot p_H 7,45 im Fluoreszenzmikroskop liegengelassen, so daß ein Teil des Schnittes vom UV-Erregerlicht getroffen wurde. Zu Beginn des Versuches waren die Vakuolen fluoreszenzfrei, die Plasmazwicker leuchteten silbrig bis grünlichgelb auf. Im Verlaufe der Bestrahlung wurden die Vakuolen der im Mittelpunkt des Gesichtsfeldes gelegenen Zellen nach 20 Minuten matt graugrün, während sich das Plasma mehr nach Gelb verfärbte. Die übrigen Zellen des Schnittes, auch die am Rand des Gesichtsfeldes gelegenen, zeigten nach wie vor keine Fluoreszenz der Vakuolen. Nach weiteren 10 Minuten war die Fluoreszenzfarbe der mattgrünen Zellen in ein helles, leuchtendes Gelbgrün übergegangen, während die übrigen Zellen des Schnittes auch weiterhin keine Vakuolenfluoreszenz wahrnehmen ließen. Ganz anders verhielten sich hingegen die vollen Zellsäfte der Außenepidermis. Auch hier wurden Schnitte im Fluoreszenzmikroskop belassen und auf Fluoreszenzwechsel untersucht. Die kräftig rot leuchtenden Vakuolen zeigten aber auch nach 45 Minuten langer Einwirkung des UV-Lichtes keinerlei Veränderung in Farbton und Intensität ihrer Fluoreszenz. Ein Schnitt der Innenepidermis der austreibenden Zwiebel, der nebeneinander leere und volle Zellsäfte nebst allen Übergängen zeigte, wurde auch nach dem Anfärben im Fluoreszenzmikroskop liegengelassen; dazu wurde eine Stelle ausgewählt, die neben fluoreszenzfreien auch mattrote und rote Vakuolen hatte, wobei die roten aber nicht so blutrot leuchteten wie die vollen Zellsäfte der Außenepidermis. Nach 10 Minuten waren die vorerst fluoreszenzfreien und die mattroten Vakuolen graugrün, die roten zeigten noch keinen Wechsel ihrer Fluoreszenzfarbe. Nach weiteren 10 Minuten waren auch diese roten Zellen graugrün, zeigten aber doch daneben noch einen deutlich wahrnehmbaren roten Schimmer. Nach weiteren 10 Minuten waren alle Zellen gelblichgrün, aber bei den vorher roten war auch jetzt noch ein roter Schimmer wahrzunehmen. Es scheint so, als ob hier beide Färbemechanismen nebeneinander gingen und in den buntscheckigen rosa und roten Zellen sowohl Ionenfärbung als auch chemische Bindung der Farbbasenmoleküle an zelleigene Stoffe stattfände. Ersteres würde den Fluoreszenzwechsel, letzteres die Rotfluoreszenz in ein und derselben Zelle verständlich machen.

Bei einer anderen austreibenden Zwiebel, die aber in Neutralrot keine Buntfärbung, sondern einheitliche Rotfluoreszenz der Vakuolen zeigte (auch in Akridinorange waren die Vakuolen einheitlich grün gefärbt), konnte auch nach halbstündiger UV-Strahlen-Einwirkung keinerlei Änderung der Fluoreszenz wahrgenommen werden.

Um zu sehen, ob die chemische Bindung des Neutralrot an zelleigene Stoffe im allgemeinen oder die Bindung an einen bestimmten Stoff die Rotfluoreszenz bedingen, wurde eine Reihe anderer Pflanzen mit vollen, aber vergleichsweise auch mit leeren Zellsäften fluoreszenzoptisch untersucht. Auch hier wurden stets gleichwertige Schnitte (Blattunterseite — Epidermis) sowohl in Neutralrot p_H 7,45 als auch in Akridinorange p_H 7,45 eingelegt, um mit Sicherheit leere und volle Zellsäfte zu identifizieren.

b) Versuche mit verschiedenen Pflanzen

Leere Zellsäfte:

Epipactis latifolius:

Die Epidermiszellen haben leere Zellsäfte, die Schließzellen volle. Die mit Neutralrot im Hellfeld erdbeerrot gefärbten Vakuolen der Epidermiszellen leuchten im UV-Licht nicht auf. Die Schließzellen speichern das Neutralrot in großen Tropfen, diese erscheinen in der Fluoreszenz dunkel.

Orchis maculata:

Die im Hellfeld erdbeerrot gefärbten Vakuolen leuchten im UV-Licht nicht auf. Die Plasmazwikel leuchten hell grüngelb. Die Außenwände der Schließzellen leuchten orangegelb.

Orchis militaris:

Die leeren, im Hellfeld erdbeerroten Zellsäfte leuchten im UV-Licht nicht auf. Die Plasmazwikel leuchten silbrig.

Volle Zellsäfte:

*Coronilla varia*¹:

Die im Hellfeld kräftig violettroten Vakuolen leuchten im UV-Licht rot. Die Membranen erscheinen farblos, im toten Randfeld aber rosagelb.

Lathyrus pratensis:

Die im Hellfeld stark violettrot gefärbten Zellsäfte leuchten im Fluoreszenzmikroskop rot auf.

Lotus corniculatus:

Die im Hellfeld nicht besonders stark violettrot angefärbten Vakuolen fluoreszieren schwach rot, die großen schwarzroten Entmischungstropfen hingegen erscheinen im UV-Licht dunkel, nicht fluoreszierend.

Vicia cracca:

Die im Hellfeld schwach violettrot gefärbten Vakuolen leuchten auch im UV-Licht nur matt rosarot.

Daphne laureola:

Die Vakuolen der Epidermiszellen sind hier besonders stark violettrot angefärbt. Sie erscheinen im UV-Licht leuchtend rot. Die Rotfluoreszenz der Vakuolen überstrahlt hier sogar die Fluoreszenz der Chlorophyllkörner in den Parenchymzellen.

Cerintho minima:

Die im Hellfeld zart violettroten Zellsäfte leuchten rosarot im UV-Licht.

¹ An dieser Pflanze wurde die Rotfluoreszenz neutralrot gefärbter voller Zellsäfte erstmalig im Zellphysiologischen Praktikum, das unter Leitung von Prof. Höfler und Doz. Hofmeister stand und dessen technische Vorbereitung mir oblag, beobachtet.

Calamintha alpina:

Die Epidermiszellen zeigen im Hellfeld violettrot gefärbte Vakuolen mit zahlreichen dunkelroten Entmischungstropfen. Auch hier fluoreszieren die Zellsäfte zart rot, während die Entmischungstropfen im UV-Licht schwarz erscheinen.

Digitalis ambigua:

Auch hier wieder rosarote Fluoreszenz der zart violettroten Zellsäfte, während die zahlreichen dunkelroten Entmischungstropfen im UV-Licht nicht aufleuchten.

Anacamptis pyramidalis:

Die Vakuolen der Epidermiszellen sind im Hellfeld größtenteils stark violettrot gefärbt, im UV-Licht erscheinen sie leuchtend rot. Einzelne im Hellfeld weniger stark angefärbte Vakuolen fluoreszieren nur rosa.

Auch diese stark rot fluoreszierenden Zellsäfte wurden auf Fluoreszenzwechsel untersucht. Schnitte, die nach dem Färben im Fluoreszenzmikroskop liegenblieben, zeigten aber selbst nach $\frac{3}{4}$ Stunden langer Einwirkung des UV-Lichtes keinerlei Änderung ihrer Fluoreszenz.

Cephalanthera alba:

Die Epidermiszellen erscheinen im Hellfeld nur schwach violettrot, die Schließzellen sind dunkel gefärbt. Im UV-Licht fluoreszieren die Zellsäfte der Epidermiszellen schwach, die der Schließzellen kräftig rot.

Cephalanthera rubra:

Die Vakuolen der Epidermiszellen sind schwach violettrot gefärbt. In den Zellen liegen dicht zu Trauben zusammengedrückte dunkelrote Entmischungskugeln. Auch hier leuchten die Zellsäfte zart rot auf, während die Entmischungskugeln nicht fluoreszieren und schwarz erscheinen.

Platanthera bifolia:

Die im Hellfeld dunkelviolettroten Zellsäfte der Epidermiszellen und der Schließzellen leuchten im UV-Licht rot auf.

III. Zusammenfassung

Volle und leere Zellsäfte verschiedener Pflanzen wurden nach Anfärben mit Neutralrotlösung p_H 7,45 fluoreszenzoptisch untersucht. Für die leeren Zellsäfte, bei denen die im Hellfeld erdbeerrote Färbung auf Ionenspeicherung beruht, trifft Struggers Angabe über Fluoreszenzfreiheit zu. Anders aber verhalten sich die vollen Zellsäfte, deren im Hellfeld violettrote Anfärbung auf Bindung der eindringenden Farbbasenmoleküle an zelleigene Stoffe beruht. Sie leuchten im UV-Licht rot auf. Fluoreszenzfarbe und Intensität des Aufleuchtens sind weitgehend von der Intensität der Hellfeldfärbung abhängig. Auch scheint nicht die Bindung an einen bestimmten Stoff, sondern allgemeine Bindung des Farbstoffmoleküls an zelleigene Stoffe die Fluoreszenz zu bewirken. In den Vakuolen vorkommende Entmischungs-

tropfen fluoreszieren nicht. Der von Strugger beschriebene Fluoreszenzwechsel trifft für die leeren, nicht aber für die vollen Zellsäfte zu. In den Zellsäften buntscheckiger, austreibender Zwiebeln dürften beide Speichermechanismen (Ionenspeicherung und chemische Bindung) nebeneinander wirken.

Literatur

- Drawert, H., 1938: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 56, 123.
- 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 134, 159.
- Haitinger, M., 1938: Fluoreszenzmikroskopie. Leipzig.
- Höfler, K., 1946: Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'acridine et le rouge neutre. Compt. rend. Ac. Sc. Paris 223, 335.
- 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., I. Abt., 156, 585.
- 1949: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Mikroskopie, 1. Sonderband: Fluoreszenzmikroskopie.
- Ruhland, W., 1908: Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Jahrb. wiss. Bot. 46, 1.
- Strugger, S., 1935: Beiträge zur Gewebephysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 24, 108.
- 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56.
- 1940: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 54, 601.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin.

Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln¹

Von

Friedl Weber und Griseldis Kenda

Mit 14 Textabbildungen

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

(Eingelangt am 30. September 1951)

Molisch (1885) hat in den Epidermiszellen von *Epiphyllum truncatum* eigenartig geformte Gebilde gesehen und sie richtig als „Proteinkörper“ erkannt. Eine Nachprüfung von Chmielewski (1887) hat die Angaben von Molisch bestätigt. Nach einem Bericht von Heinricher (1889) hat Leitgeb solche Zellinhaltskörper auch bei *Opuntia virens* gefunden. Gicklhorn berichtete 1915 über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei anderen *Opuntia*-Arten, Küster (1934) hat sich hauptsächlich mit der Gestalt und Struktur dieser „anisotropen Fibrillenbündel“ beschäftigt und ist 1948 nochmals darauf zurückgekommen, indem er die Eiweißspindeln von *Impatiens* mit denen von *Epiphyllum* verglich. Zu wenig Beachtung fand der Nachweis von Mikosch (1907), daß bei seinen Versuchspflanzen in *Epiphyllum truncatum* nur dann Eiweißspindeln auftraten, wenn die Sprosse auf *Pereskia aculeata* gepfropft waren, einer Unterlage, die selbst Eiweißspindeln besaß. Mikosch sah darin einen Beweis für die stoffliche Beeinflussung des Reises durch die Unterlage. Klehbahn (1928) scheint als erster auf Grund seiner Erfahrungen an viruskranken Anemonen und Tabakpflanzen an die Möglichkeit gedacht zu haben, daß es sich bei den Eiweißspindeln von *Epiphyllum* um ein Krankheitssymptom handeln könne, das durch einen Viruserreger hervorgerufen wird. Dieser Möglichkeit trägt Köhler (1934) insofern Rechnung, als er in seinem Handbuchartikel über Viruskrankheiten bei Besprechung der Einschlusskörper in einer Anmerkung auch auf die *Epiphyllum*-Eiweißspindeln hinweist. Eine experimentelle Prüfung dieser Frage hat Rosenzopf (1951) versucht. Auf Grund von Impf- (Infektions-) Versuchen mit *Epiphyllum*-Arten und *Pereskia* kam sie zu folgendem Ergebnis: Bei Pfropfung geht das die Spindelbildung veranlassende Agens von dem spindelhaltigen auf den spindelfreien Pfropfpartner über. Injektion von Gewebesafte spindelhaltiger Pflanzen hat das Entstehen von Eiweißspindeln in den vorher spindelfreien Pflanzen zur Folge. Auf Grund dieser und anderer Ergebnisse vertritt die Autorin die Ansicht, daß die in Kakteen vorkommenden Eiweißspindeln Virus-Einschlusskörper sind. Während manche Virus-Einschlusskörper klein und in der lebenden Zelle schwer zu sehen sind, werden die Eiweißspindeln der Cactaceen meist groß, und

¹ Hans Fitting zum 75. Geburtstag gewidmet.

sie sind schon in vivo leicht zu beobachten; diese Eiweißspindeln dürften daher ein besonders günstiges Objekt darstellen, um die Eigenschaften und die Entstehungsweise der Viruskristalle in der Zelle zu studieren. In dieser Mitteilung wird über die Morphologie dieser Gebilde berichtet.

Besonders große und mannigfaltig geformte Eiweißgebilde fanden wir in der Epidermis und im Grundgewebe einer Cactacee, von der, soweit wir sehen, das Vorkommen von „Eiweißspindeln“ noch nicht bekannt ist, nämlich *Rhipsalis cereuscula*. Untersucht wurden Sproßglieder einer Pflanze, die auf *Pereskia aculeata* gepfropft ist (Abb. 1). Die Pflanze, die aus dem Wiener Botanischen Garten bezogen wurde, wird seit einem Jahr im Grazer Botanischen Garten gehalten, sie wurde mir in entgegenkommender Weise zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die peripheren Gewebe, vor allem

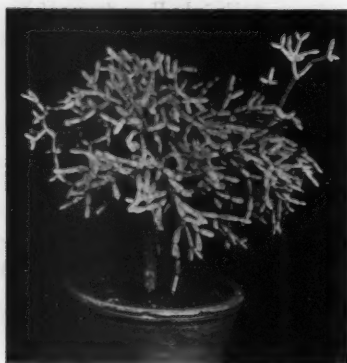
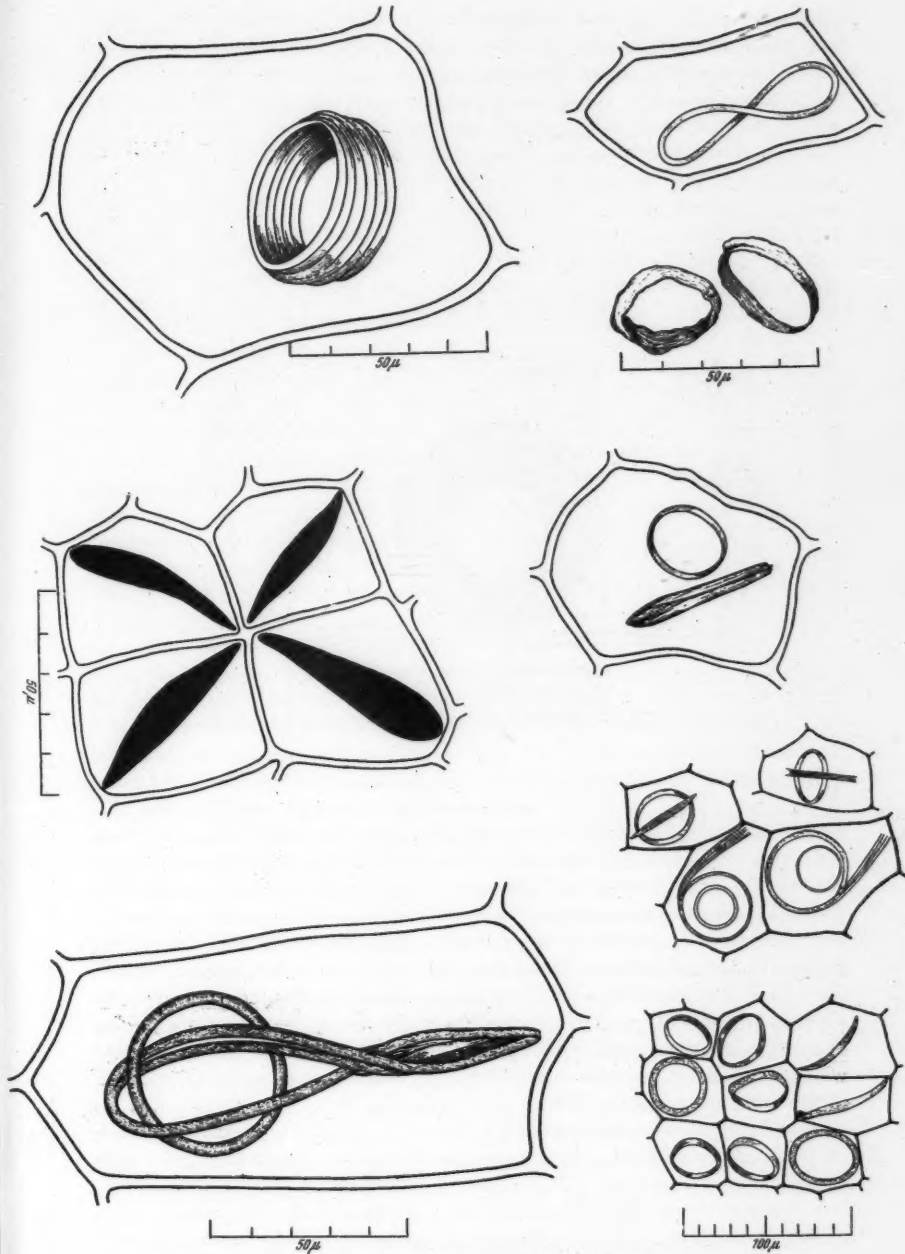


Abb. 1. *Rhipsalis cereuscula* auf *Pereskia aculeata* gepfropft.

die Epidermis und Subepidermis der Sprosse (mit Ausnahme des jüngsten, noch nicht voll entwickelten Gliedes), sind reich an oft auffallend großen Eiweißgebilden;¹ manchmal herrschen typische Spindeln vor, manchmal ringförmige, nicht selten sind Sechser (Abb. 2). Zum Vergleich wurden die Sprosse einer wurzelechten gezogenen *Rhipsalis* derselben Art untersucht. Die Gewebe dieser Pflanze sind vollkommen frei von Eiweißspindeln. Von der *Pereskia*-Unterlage, auf der die *Rhipsalis* gepfropft ist, konnten wir, um das Reis nicht zu gefährden, nur ein kleines Fragment untersuchen. Es fanden sich darin keine Eiweißspindeln. Das beweist aber nicht, daß die *Pereskia*

virusfrei ist, denn bei *Pereskia* kommen die Eiweißspindeln hauptsächlich in den Blättern vor, in älteren mit Periderm versehenen Stämmen aber nicht. Im allgemeinen sind *Pereskia*-Pflanzen, die in Gewächshäusern gezogen werden, Virusträger. Durch das Entgegenkommen der Direktion des Wiener Botanischen Gartens erhielt ich einen beblätterten Sproß von demselben *Pereskia*-Klon, auf den die *Rhipsalis* gepfropft werden. In den Blättern dieser Pflanze sind Eiweißspindeln reichlich vorhanden. Auch in einer zweiten, mir ebenfalls zur Verfügung gestellten, auf dieser *Pereskia* gepfropften *Rhipsalis cereuscula* finden sich Spindeln und anders geformte Eiweißgebilde in Masse. Das Eiweißspindeln enthaltende *Rhipsalis*-Pfropfreis unserer Pflanze ist zwar gut entwickelt, unterscheidet sich aber von den spindelfreien, frischgrünen wurzelechten *Rhipsalis*-Pflanzen durch eine gelb-

¹ Die Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates enthalten regelmäßig große Spindeln, dagegen fehlen sie den Schließzellen. In diesem Verhalten entspricht *Rhipsalis* der Regel, daß die Stoma-Zellen frei von Eiweißkristalloiden sind (Kenda, Thaler, Weber 1951, Brat, Kenda, Weber 1951).

Abb. 2. Eiweiß-Viruskörper verschiedener Gestalt aus *Rhipsalis*.

grüne, blasse Färbung der Sprosse. Es ist wohl möglich, daß dieser Chlorophylldefekt ein Symptom der Virus-„Erkrankung“ ist. Abgesehen von den am häufigsten vertretenen Formen, Spindeln und Ringen, treten manchmal auch Achter auf. Die Ringe können recht verschieden breit sein, bisweilen sind sie so breit, daß man sie besser als ringförmige Bänder bezeichnen sollte (Abb. 3). Die Entstehung der Ringe stellte man sich bisher so vor, daß sich die Spindeln nach ergiebigem Längenwachstum aus „Raumnot“ gebogen und zu geschlossenen Ringen zusammengelegt haben. „Wird ihr Wachstum noch weiter fortgesetzt, so entstehen 8-ähnlich gebogene Figuren“ (Küster 1951: 438). Die Möglichkeit einer solchen Entstehung der Ringe und Achter soll nicht bezweifelt werden, sie wurden auch bei Virus-Einschlußkörpern beobachtet (Bawden 1950: 48, Weber 1951). In den Zellen von *Rhipsalis*

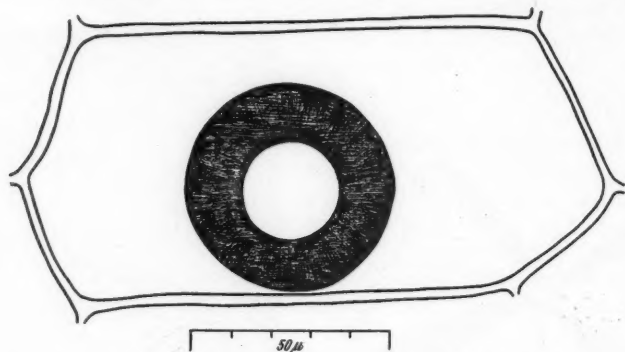


Abb. 3. Ringförmige Viruskörper von *Rhipsalis* bandartig.

finden sich aber manchmal auch recht kleine Ringe, die offenbar nicht unter „Raumnot“ leiden. Was die Achter betrifft, so konnte bei *Rhipsalis* eine andere als die bisher vermutete Entstehungsweise direkt beobachtet werden: Die Ringe verändern in den Zellen ihre Lage relativ rasch, in etwa 10 Minuten können sie ihre Stellung um 90 Grad drehen; dabei zeigen sie mehr oder weniger starke Deformierungen. So kommt es nun auch vor, daß ein Eiweißring zu einer Achterschleife wird. Ob bei den Lageveränderungen und Drehungen Plasmaströmungen die (alleinige) Ursache sind oder ob (auch) Kräfte, die in den Eiweißgebilden selbst liegen, eine Rolle spielen, können wir nicht sagen. Die blitzartig rasche Drehung, bei der im Verlauf von Sekunden unter den Augen des überraschten Beobachters aus einem Ring ein Achter und dann wieder umgekehrt aus dem Achter ein Ring werden kann, spricht für Spannungsänderungen, die im Viruskörper sich abspielen.

Für *Epiphyllum truncatum* hat Küster (1954, 1951) angegeben, daß selbener als die festgefügteten Eiweißspindeln solche sind, „die zu lockeren Faserbündeln oder Garben sich auflösen oder gar in einzelne Fibrillen zerfallen“. Lose Aggregate von Nadeln hat Mikosch (1890) auch für *Oncidium microchilum* beschrieben. Bei der von uns untersuchten *Rhipsalis* fanden sich An-

häufungen loser Nadeln nur selten; die Eiweißnadeln können sehr fein sein, etwa so wie die von Köhler (1942: 60) abgebildeten Nadelkristalle im Parenchym einer X-Viruskranken Kartoffelknolle. Einmal hatten die nadel-förmigen Fasern eine auffällige Anordnung (Abb. 4). In der Mitte der Zelle lag in einer Plasmaansammlung eine Gruppe stark lichtbrechender Gebilde (x-body?); an diese heran traten die Eiweißfasern, die von zwei Polen ausstrahlten. Das sich so ergebende Bild war in frappanter Weise dem Metaphase-Stadium einer Mitose ähnlich. Sowohl die Fasern als auch die in der Äquatorebene liegenden, verschiedengestaltigen Körper waren doppelbrechend. Da ja auch die Spindelfasern der Metaphase doppelbrechende Gebilde sind (Schmidt 1939, Mühldorf 1951), so verdient diese Anordnung der Virusnadeln Interesse.

Die Eiweißspindeln können entweder homogen erscheinen oder aber eine mehr oder weniger deutliche Längsstreifung erkennen lassen; das wird von allen Beobachtern angegeben. Die *Rhizalis*-Spindeln ließen manchmal eine andere Struktur erkennen, deren Deutung zunächst Schwierigkeit bereitete. Man hat den Eindruck, als ob die große Spindel sich aus vielen, schraubig angeordneten kleinen Spindeln zusammensetzen würde (Abb. 5). Diese Struktur scheint dann zustande zu kommen, wenn die Makrospindel sich aus vielen zarten Fibrillen zusammensetzt und diese Fibrillen nicht (wie das sonst der Fall ist) parallel verlaufen (wodurch die Längsstreifung zustande käme), sondern tordiert und verflochten sind. Die ganze Spindel hat also einen Bau wie ein aus Strängen zusammengesetztes Seil oder wie ein geflochtener Zopf. Deutlicher wird dieser Aufbau, wenn die Spindel nicht aus vielen feinen, sondern aus wenigen gröberen Strängen sich zusammensetzt. Soeben ist eine kurze Mitteilung von Köhler und Bode (1951) erschienen, worin ein elektronenmikroskopisches Bild des Kartoffel-X-Virus wiedergegeben wird, wie es aus einem nicht gereinigten Presssaft gewonnen wurde. Die Ähnlichkeit mit dem lichtmikroskopischen Bild der intracellulären Viruskörper von *Rhizalis* ist vollkommen. Das gleiche Prinzip der Verflechtung, das den submikroskopischen Bau des Kartoffelvirus beherrscht, kommt bei Einschlußkörpern in den lebenden Zellen von *Rhizalis* in dem höheren Niveau der lichtmikroskopischen Dimension ebenfalls zur Geltung. Während die elektronenmikroskopischen „Zöpfe“ des Kartoffel-X-Virus meist dreiteilig sind, bestehen die lichtmikroskopischen „Zöpfe“ in den *Rhizalis*-Zellen häufig aus einer größeren Anzahl von Teilen. Nach einer weiteren Mitteilung von Köhler und Bode (1951) stellen auch die elektronenmikroskopischen Stäbchen des Tabakmosaik-Virus in Wirklichkeit spiralig verlaufende Bänder oder Fäden vor.

Auch die Ringe, die in der Regel homogen erscheinen, lassen bisweilen

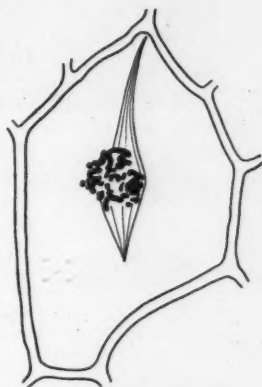


Abb. 4. Metaphase-Spindelähnliche Anordnung der Virusfasern.

mehr oder weniger deutlich einen Aufbau aus zahlreichen, zarten, verflochtenen Strängen erkennen.

An einem mit der Säurefuchsin-Methode nach Zimmermann (1892) gefärbten Präparat von *Rhipsalis* fand sich in einer im Grundgewebe gelegenen

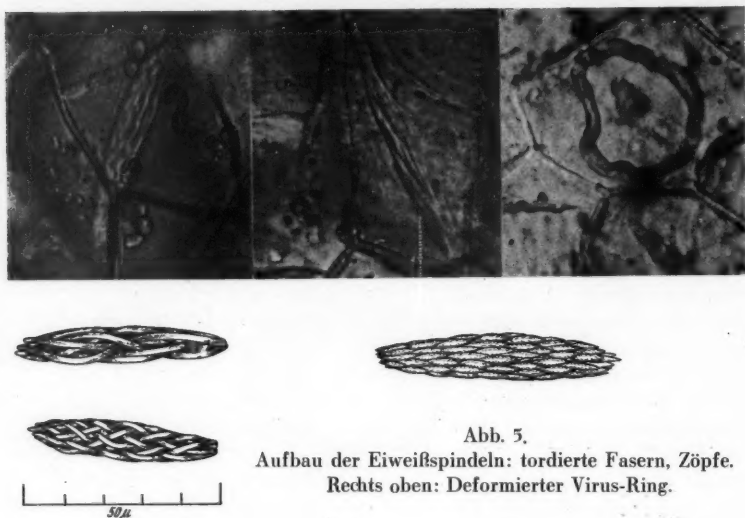


Abb. 5.
Aufbau der Eiweißspindeln: tordierte Fasern, Zöpfe.
Rechts oben: Deformierter Virus-Ring.

großen Schleimzelle ein auffallendes Aggregat von Eiweißkristallen; es lag in der Mitte der Zelle und war intensiv rot gefärbt wie die Eiweißspindeln (Abb. 6). Die besonderen Verhältnisse der Schleimzelle hat offenbar die eigenartige Gestalt des Viruskörpers bedingt. Verletzte Sprosse von *Rhipsalis* nehmen oft ein bis mehrere Tage nach der Verwundung eine kupferrote Färbung an. In einzelnen Zellen können dann Aggregate von rotgefärbten Kristallen auftreten, die stark doppelbrechend sind. Ihre Natur ist unbekannt, Karotinkristalle sind es wohl nicht, da sie sich in Schwefelsäure nicht blau färben¹. Manchmal sieht man auch einzelne rote, nadelartige Kristalle. Diese liegen in einem unregelmäßig konturierten Körper, der außerdem stark lichtbrechende Körnchen einschließt. Das ganze Gebilde ähnelt den x-bodies in den Zellen viruskranker Pflanzen (Abb. 7 a). Die in Abb. 8 dargestellten Gebilde dürften ebenfalls x-bodies sein; sie sind kugelig, ziemlich scharf gegen das übrige Cytoplasma abgegrenzt, zeigen leicht wogende Bewegung und sind mit verschiedenen großen, stark lichtbrechenden Körnchen erfüllt; sie umhüllen oft den Zellkern (Bawden 1950: Fig. 8, 17).

¹ Es ist wahrscheinlich, daß die Substanz, die die roten Kristalle bildet, mit dem von Molisch (1928) bei verschiedenen Kakteen gefundenen Farbstoff „Kaktorubin“ identisch ist. Molisch gibt allerdings an, daß der Farbstoff auf keine Weise zum Kristallisieren gebracht werden kann. Vielleicht ermöglichen die in den viruskranken Zellen gegebenen Bedingungen die Kristallisation.

Ein saturnartiges Bild bot eine x-body-Kugel, die von einem Eiweißring umgeben war; die Kugel lag allerdings nicht ganz in der Mitte des Ringes, sondern etwas exzentrisch, an dem einen Pol stand der Ring in Kontakt mit

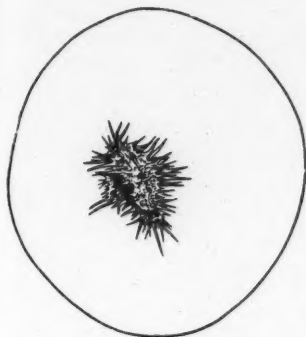


Abb. 6. Aggregat von Viruskristallen in einer Schleimzelle von *Rhipsalis*.

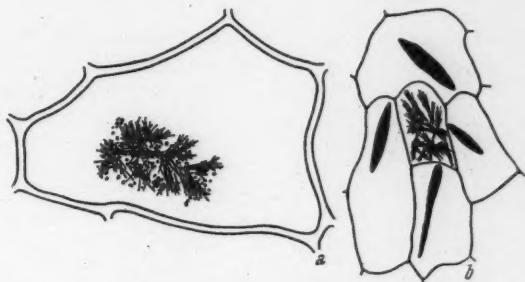


Abb. 7. *Rhipsalis*. a Kaktorubin-Kristalle in einem x-body eingeschlossen. Lebende Zelle. b In der Mitte eine tote Zelle mit Kaktorubin-Kristallen. Die umgebenden lebenden Zellen mit Eiweißspindeln.

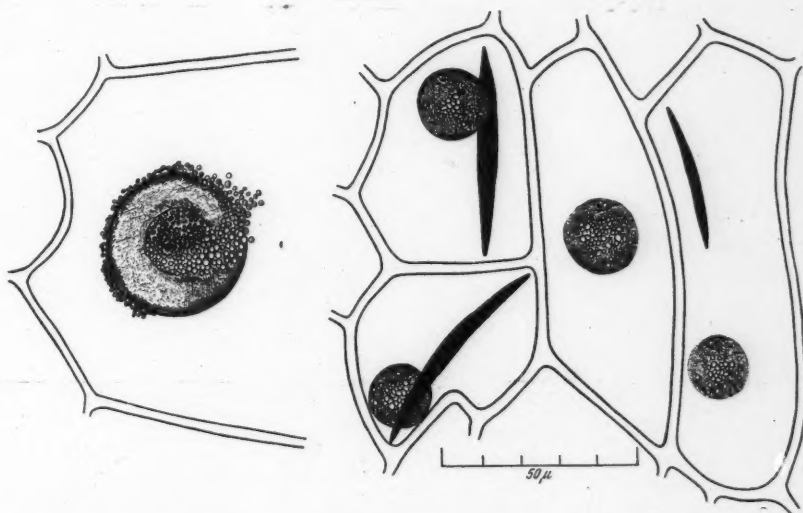


Abb. 8. Kugelförmige x-bodies in Zellen von *Rhipsalis*.

der Kugel (Abb. 9). Dieses Bild ist aus zwei Gründen von Interesse: 1. zeigt es, daß nicht Platzmangel die Bildung des Ringes in der großen Zelle veranlaßt, 2. spricht es für die Entstehung des Virusringes „aus“ der x-body-

Kugel. Da in dieser Zelle der sonst gut sichtbare Zellkern nicht zu sehen war, darf angenommen werden, daß er sich im Inneren der Kugel befand. Der Kontakt der x-body-Kugel mit dem Zellkern einerseits und des Virus-Eiweißringes mit dem x-body andererseits ist beachtenswert, da ja vermutet wird, daß die Ribonucleoproteide des Cytoplasmas aus dem Zellkern stammen, aus dem sie in das Cytoplasma abgegeben werden; die Viren, speziell die pflanzlichen, bestehen jedenfalls aus Ribonucleoproteiden. Ein anderes Mal wurde ein kleiner, zarter, junger Virus-Eiweiß-Achter beobachtet, der aus einer x-body-Kugel herausragte. Er führte ziemlich rasche ständige Formveränderungen aus (Abb. 10). Auch hier hat man ganz den Eindruck,



Abb. 9. *Rhipsalis*. Kugelförmiger x-body von einem ringförmigen Virus-Körper umgeben.

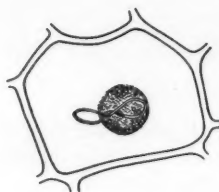


Abb. 10. *Rhipsalis*. Junger Virus-Achter in Kontakt mit einer x-body-Kugel.

daß der Eiweißachter im x-body gebildet wird. Schließlich sei noch die Zeichnung einer *Rhipsalis*-Zelle wiedergegeben, in der der größte Teil des Protoplasten mit einem Geflecht zarter Eiweißfäden erfüllt war (Abb. 11).

Die Beobachtungen wurden in der Regel an lebenden, in Wasser liegenden Flächenschnitten gemacht. Wird zu diesen Jodjodkali zugesetzt, so verhalten sich die Eiweißspindeln recht verschieden, je nachdem das Reagens langsam oder rasch zu den Zellen zutritt. Im ersteren Falle werden die Eiweißgebilde unter Braunfärbung fixiert, ohne daß sie ihre äußere Gestalt merklich ändern würden. Die faserige oder tordierte Struktur wird dabei allerdings unkenntlich und die Gebilde erscheinen kompakt, homogen. Tritt das Jodjodkali aber rasch zu, so tritt meist unter Quellung eine Kontraktion ein, die manchmal bis zur Abkuglung führen kann. Bei *Rhipsalis* und in gleicher Weise bei *Epiphyllum* tritt dabei nicht selten eine eigenartige Verdrehung der Spindeln ein (Abb. 12). Die Kontraktion und Tordierung ist in Wasser reversibel. Vergleiche Weber 1951 a.

Das Abkugeln der Spindeln, das sich in der Regel auch in absterbenden Zellen einstellt, zeigt, daß die Spindeln leicht in den flüssigen Aggregatzustand übergehen können, in ungestörten Zellen sind sie aber recht steif,

das geht daraus hervor, daß sie bei Plasmolyse dem Zug des sich kontrahierenden Protoplasten nicht nachgeben und daher aus diesem herauszüragen scheinen (Abb. 13). Die Zellmembran der viruskranken *Rhipsalis* zeigt nicht selten Bildungsstörungen, bisweilen von cystolithenähnlicher Gestalt (Abb. 14). Die Schließzellen sind meist kollabiert. Ob und in welcher Weise diese Anomalien mit der Viruserkrankung zusammenhängen, bleibt zu untersuchen.

Von Interesse wird das Verhalten der *Cactaceen-Virus-Körper* gegenüber

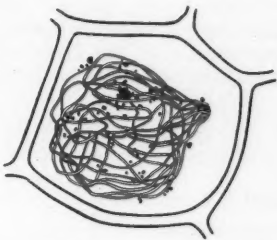


Abb. 11. Geflecht von Eiweißfäden aus einer *Rhipsalis*-Zelle.

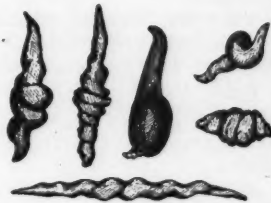


Abb. 12. Eiweißspindeln aus *Epiphyllum truncatum* in Jodjodkali-Lösung deformiert.

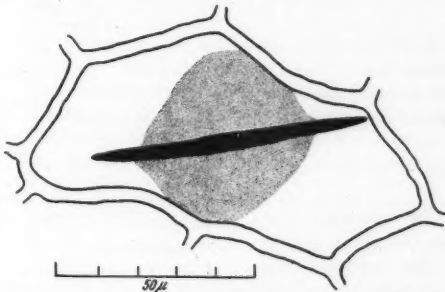


Abb. 13. Zelle aus *Rhipsalis* mit Eiweißspindel, plasmolysiert.

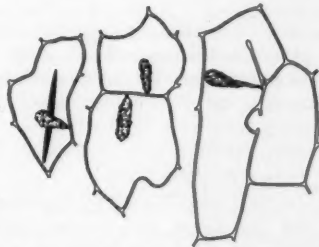


Abb. 14. Abnormale Membranbildungen der viruskranken *Rhipsalis*-Zellen.

Ribonuclease sein. Die pflanzlichen Viren sind Feulgen-negativ, sie enthalten nicht Thymo-, sondern Ribonucleinsäure. Auch die Methoden, die Bald (1949) zur Fixierung und Färbung der Viruskörper in Pflanzenzellen ausgearbeitet hat, sollen an *Rhipsalis* erprobt werden.

Zusammenfassung

Rhipsalis cereumula enthält, wenn sie auf *Pereskia aculeata* gepfropft ist, hauptsächlich in der Epidermis und Subepidermis der Sprosse zahlreiche große Eiweißgebilde verschiedener Gestalt. Diese Gebilde werden als Virus-

körper gedeutet. Die Eiweißspindeln lassen bisweilen einen zopfartigen Aufbau aus einer Anzahl von einzelnen Strängen erkennen. In manchen Zellen sieht man x-body-artige Plasmakugeln, mit denen die Virus-Eiweißkörper bisweilen in Kontakt stehen.

Literatur

- Bald, 1949: Additional methods for fixing and staining viruses in infected plant tissues. *Americ. J. Botany* 36.
- Bawden, 1950: *Plant Viruses and Virus Diseases*. Waltham, Mass.
- Brat, Kenda, Weber, 1951: Rhabdoide fehlen den Schließzellen von *Drosera*. *Protoplasma* 40.
- Chmielewski, 1887: Eine Bemerkung über die von Molisch beschriebenen Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Botan. Centralbl.* 31.
- Gicklhorn, 1915: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. *Österr. Botan. Z.* 63.
- Heinricher, 1889: Hubert Leitgeb. *Mitteil. Naturw. Ver. Steiermark* 1888. Graz.
- Kenda, Thaler, Weber, 1951: Kern-Kristalloide in Stomata-Zellen? *Protoplasma* 40.
- Köhler, 1942: Eiweißkristalle in Virus-infizierten Kartoffelknollen. *Nachrichtenblatt Deutsch. Pflanzenschutzdienst* 22.
- und Bode, 1951: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kartoffel-X-Virus. *Naturwissenschaften* 38, 355.
- und Bode, 1951 a: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Tabakmosaikvirus. *Naturwissenschaften* 38, 451.
- Küster, 1954: Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. *Ber. deutsch. botan. Ges.* 52.
- 1948: Über die Eiweißspindeln von *Impatiens*. *Biol. Zentralbl.* 67.
- 1951: *Die Pflanzenzelle*. II. Aufl. Jena.
- Milovidov, 1949: *Physik und Chemie des Zellkernes*. Berlin.
- Mikosch, 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. *Ber. deutsch. botan. Ges.* 8.
- 1907: Über den Einfluß des Reises auf die Unterlage. *Linsbauer: Wiesner-Festschrift* 1908. Wien.
- Molisch, 1928: Über ein bei Kakteen vorkommendes, einen roten Farbstoff lieferndes Chromogen. *Ber. Deutsch. Botan. Ges.* 46.
- Mülldorf, 1951: *Die Zellteilung als Plasmateilung*. Wien.
- Schmidt, 1939: Doppelbrechung der Kernspindel. *Chromosoma* 1.
- Weber, 1951: Viruskörper fehlen den Stomazellen. *Protoplasma* 40.
- Weber, 1951 a: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. *Phyton (Austria)* 5.
- Zimmermann, 1892: *Botanische Mikrotechnik*, Tübingen.

Referate

Bajer, A.: Electrical forces in mitosis I. Acta Soc. bot. Polon. 20, 709—737 (1950).

Untersuchungen im homogenen elektrostatischen Felde ergeben keine elektrische Ladung der Chromosomen mitotischer oder intermitotischer Kerne; auch sind weder Beschleunigungen noch Verzögerungen der Chromosomenbewegung bei Mitwirken des Feldes parallel dazu nachgewiesen worden. Dennoch ist ein solches nicht wirkungslos, sondern führt zu Störungen im Bewegungsmechanismus und in der Struktur der Chromosomen. Bei starken Feldern kommt die Teilung nach Minuten, die Plasmateilung nach einigen Stunden zum Stillstand. Nach Ausschalten eines schwächeren Feldes kann die Mitose einen wenn auch im Ablauf gestörten Fortgang finden.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Bericht von der 50. Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft vom 3. bis 5. Mai 1951 in Göttingen. Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 55, Nr. 6, S. 445—592 (1951).

Das auf dieser Tagung diskutierte Hauptthema „Physikalisch-chemische Probleme der Biologie“ läßt es wünschenswert erscheinen, auch an dieser Stelle auf die Drucklegung der mitgeteilten Beiträge hinzuweisen, soweit sie den Protoplasmatiker besonders angehen. Das gilt schon für K. H. Meyers Übersicht der molekularen Leptonik biologischer Systeme (S. 453), die sich mit den Kettenmolekeln auch des Protoplasmas und mit Folgerungen bezüglich ihrer Lage, Form und deren Veränderung befaßt. Von T. Teorell wird eine erweiterte Theorie der Permeabilität konvektionsfreier Membranen mit „fixierten“ Ladungen (S. 460) vorgelegt; die entwickelten Formeln beziehen sich auf Systeme unter äußerem elektrischem Stromfluß ebenso wie auf solche ohne Strom, also mit freier Diffusion. Mittels radioaktiver Isotope hat Hans H. Ussing zwischen aktivem Transport und Diffusion zu unterscheiden versucht (S. 470), während G. Manecke und K. F. Bonhoeffer die elektrische Leitfähigkeit von Anionenaustauschmembranen (S. 475) untersucht haben. Bemerkenswert ist auch die Mitteilung von O. Kratky, G. Porod und E. Treiber, die Deformationen von Fasern diskutieren, bei denen aufeinanderfolgende Mizellen durch laminare Bereiche verhängt sind, so daß gegenseitige Verdrehungen nur um die Querrichtung möglich sind (S. 481). Mit muskelähnlichen Arbeitsleistungen von Hochpolymeren machen W. Kuhn und B. Hargitay in ihren Untersuchungen mit Polyacrylsäure (S. 490) bekannt. Es handelt sich hierbei um kontraktile Systeme (Fäden), welche auf veränderte Ionisation in ihrem Molekelwerk eingebauter ionisierbarer Gruppen ansprechen, ja in begrenztem Maße auch das für den Muskel kennzeichnende Phänomen des *quick release* zeigen. Ergänzend dazu berichtet Hans H. Weber über Aktomyosinmodelle (S. 511), welche mit Adenosintriphosphat und nur mit diesem zu Kontraktionen führen; auch die Muskelkontraktion dürfte danach auf einer Spaltung des Adenosintriphosphat, die Muskeler schlaffung auf Stillstand dieser Spaltung beruhen. In einer Mitteilung über den osmotischen Druck (S. 518) wird von E. A. Moelwyn-Hughes auch die Frage nach dem „freien Raum“ und dessen Berechenbarkeit angeschnitten, und an pathologischen Serumpro-

teinen werden von K. Dialer Molekulargewichts-Bestimmungen mittels Ultrazentrifuge (S. 525) behandelt, während G. Oster die Bedeutung weitreichender Kräfte zwischen Molekeln für biologische Substanzen (S. 529) untersucht hat. Mit dem Wachstum der belebten Substanz zum Unterschied von dem der Kristalle (S. 531) beschäftigt sich der Bericht von H. Lettré. Der Diffusionsweg der Nährstoffe und der Abtransport der Endprodukte bedingen die Einhaltung einer nicht überschreitbaren Zellgröße, während die identische Reproduktion der Zellkonstituenten als chemisches Problem erkannt wird. Ferner werden die Bedeutung der Oberflächenspannung und osmotischer Arbeit bei der Teilung diskutiert und in der Zelloberfläche, dem Spindel- und dem Cytoplasma kontraktile Systeme analog der Muskulatur festgestellt. Passivierbare Metalle werden von U. F. Franck als Modelle der saltatorischen Nervenleitung (S. 535) herangezogen, im System aus Henleschen Schleifen und Sammelrohren in der Niere (S. 539) von B. Hargitay und W. Kuhn eine Vorrichtung zur Vervielfältigung kleiner Konzentrationseffekte zu relativ hoch konzentrierten Lösungen erkannt und auf die offenen Systeme der Organismen von R. Haase der zweite Hauptsatz (S. 566) in Form einer thermodynamisch-phänomenologischen Theorie angewandt. Die energetischen und statistischen Voraussetzungen für die Synthese makromolekularer Substanzen im Organismus (S. 569) sieht G. V. Schulz in ihrem hohen Polymerisationsgrade und in der definierten Anordnung der Grundmolekeln in den Ketten der Hochpolymeren; aus dem Versuch thermodynamischer Erfassung dieser Voraussetzungen werden Kriterien zur Prüfung vorgeschlagener Modelle des Bildungsmechanismus der Makromolekeln abgeleitet. Ohne daß alle anderen Beiträge zur Tagung hier auch nur aufgezählt werden sollen, mag endlich noch hingewiesen werden auf Versuche mit P^{32} an *Amoeba proteus* und Hühnerpestvirus (S. 575) durch H. Friedrich-Freksa und F. Kaudewitz und die Untersuchungen über die Aktivierung von Bakteriophagen (S. 580 bzw. 582) durch C. Bresch bzw. G. S. Stent. Auf den verschiedensten Gebieten der Protoplasmatik arbeitende Forscher werden also durch Beiträge der Göttinger Tagung angesprochen.

Hans H. Pfeiffer (Bremen).

Bullough, W. S., and M. Johnson: A simple technique for maintaining Mammalian epidermal mitosis in vitro. *Expt. Cell Res.* 2, 445—453 (1951).

Die Explantate vom Ohr 5—10 Monate alter männlicher Mäuse sind in Warburg-Flaschen auf Krebs-Ringer-Bicarbonat bzw. -Phosphat gezüchtet worden; eine Steigerung der Mitosenzahl ist durch hohe O_2 -Tension erzielt worden.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Dettmer, N., I. Neckel und H. Ruska: Elektronenmikroskopische Befunde an versilberten Kollagenfibrillen. *Z. wiss. Mikrosk.* 60, 290—297 (1951).

Dünne Fibrillen zeigen das Ag in groben, oberflächlich gelegenen Körnern (Würfeln), dickere feinkörnig oder kornlos im Innern. Stark versilberte Teile entsprechen C. Wolpers D-, schwächer versilberte seinen H-Ab schnitten. Die verschiedene Lokalisierung der argyrophilen Orte, vor allem aber die geringe Zahl sich entwickelnder Ag-Keime auch bei feinkörniger Entwicklung und großer Keimzahlen läßt eine chemische Deutung nicht zu, so daß nach physiko-chemischen Bedingungen an den jeweiligen (leptonischen) Strukturen zu suchen ist. H. H. Pfeiffer (Bremen).

Gaulden, M. E., and J. G. Carlson: Cytological effects of colchicine on the grasshopper neuroblast in vitro with special reference to the origin of the spindle. *Expt. Cell Res.* 2, 416—433 (1951).

Die die Spindel abbauende Wirkung des Mittels beruht wohl nicht so sehr auf einer Zerstörung der sie aufbauenden Substanzen als vielmehr ihrer

molekularen (oder leptonischen) Orientierung, wobei es zu kugeliger Anhäufung [ob nur von Karyolymphe, wie Verff. meinen, bleibe dahingestellt] ohne „mitotische Funktionen“ kommt. Wesentlich ist nach den Versuchen mit in vitro gezüchteten Embryogewebe die jeweilige Konzentration der Darbietung des Mittels.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Harding, C. V.: The action of certain polysaccharides on fertilization in the sea urchin egg. Expt. Cell Res. 2, 403—415 (1951).

Geeignete Präparate von 0,2% Heparin verhindern die Furchung bei Befruchten in der Versuchslösung, nicht aber bei Behandeln der in Wasser befruchteten Eier. Heparin inhibiert die Abhebung der Befruchtungsmembran nach Abtrennung des oberflächlichen Gels oder bei Aktivierung mit hypertonischem Seewasser; der Mechanismus dieser Wirkung erlaubt mehrere Deutungen.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Harvey, E. B., and G. I. Lavin: The eggs and half-eggs of *Arbacia punctulata* and the plutei, as photographed by ultraviolet, visible and infrared light. Exp. Cell Res. 2, 393—397 (1951).

Dieselben: Nuclei of *Arbacia* and *Chaetopterus* eggs as photographed by infrared light. Ibid. 2, 398—402 (1951).

Überzeugende Belege an gewöhnlichen und zentrifugierten Eiern und *Pluteus*-Larven bei drei verschiedenen Wellenlängenbereichen. Im Infrarot werden für *Arbacia* mitotische Figuren und Kerne hell gegen dunklen Plasmahintergrund gezeichnet; ausgesprochen opake *Chaetopterus*-Eier werden für Infrarot gut durchsichtig.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Herrath, E. v., und N. Dettmer: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gitterfasern. Z. wiss. Mikrosk. 60, 282—289 (1951).

Die lichtmikroskopisch darstellbaren Objekte werden in eine Reihe 30—45 μ dicker, unverzweigter Fibrillen aufgelöst. Eine Unterscheidung in Retikulum- und Kollagenfibrillen ist an Präparaten nach dem Versilberungsverfahren möglich.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Holleman, A. F.: Lehrbuch der Chemie. Zweiter Teil: Organische Chemie. Bearbeitet von Friedrich Richter. 27. und 28., durchgesehene und verbesserte Auflage. Mit 97 Fig. XII, 526 S. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1951. Geb. DM 24.—.

Ein Lehrbuch, das innerhalb 53 Jahren weiteste Verbreitung gefunden und nunmehr seine 28. Auflage erlebt, bedarf wohl keiner ausdrücklichen Empfehlung, geschweige denn kritischer Würdigung mehr; der „Holleman“ ist bereits zu einem festen Begriff geworden, und es darf genügen, wenn hier die wesentlichsten Vorzüge, denen das Werk in erster Linie seine Beliebtheit verdankt, nochmals hervorgehoben werden. Straffe Gliederung des Stoffes und seine gedankliche Durchdringung mit besonderer Betonung der grundlegenden Gesetze und Theorien formen ein klares Bild vom Gebäude der organischen Chemie. Bei aller Ökonomie der Darstellung wird ausgiebig auf verwandte Gebiete verwiesen; im Rahmen dieser Besprechung seien insbesondere die Absätze über Nukleoproteide und Viruseiweiß, Fette und Oberflächenvorgänge, Phosphatide und verwandte Körper, Narkotika, Photosynthese, Atmung und Gärung, Farbstoffe und Vitalfärbung, Redoxpotential u. a. m., die auf den neuesten Stand gesicherter Ergebnisse gebracht sind, hingewiesen. Es sei jedoch erinnert, daß das Buch kein Nachschlagewerk, sondern ein Lehrbuch ist, hervorragend geeignet, eine solide Basis der auch für den Biologen heute so notwendigen organischen Chemie und die Grund-

lagen für ein vertieftes Studium von Einzelfragen zu schaffen; ein Wegweiser ins chemische Schrifttum im Anhang ist hierfür ein willkommener Helfer. Auch in der vorliegenden, auf den neuesten Stand gebrachten Auflage wird der alte „Holleman“ nicht nur dem Chemiestudenten, sondern allen jenen, denen die organische Chemie als Hilfswissenschaft unentbehrlich ist, ein zuverlässiger und bewährter Führer sein. O. Härtel (Graz).

Hug, O., und W. Lippert: Grenzschichten animalischer Zellen im Elektronenmikroskop. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 213, 395—401 (1951).

Vergleichende elektronenoptische und phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen ergeben in kritischer Abwägung an Darstellungen von Thrombocyten, Leukocyten, Fischspermien und Erythrocyten, daß bei entsprechenden Bearbeitungen und Versuchseingriffen eigentlich immer eine Niederschlagsmembran zwischen zwei in Korrelation stehenden Medien statt der vielfach behaupteten, zweiseitig begrenzten Hüllschicht auftritt. Es bleibt noch zu entscheiden, ob die unter der Niederschlagsmembran sich verborgende „Grenzschicht“ die unter Einwirkung von Oberflächenkräften lose geordneten Molekellagen oder eine nach außen mehr/minder stabile Verstärkung der plasmatischen Textur darstellt; aber die Annahme einer durch „Poren“ bestimmter Weite gekennzeichneten starren Membran findet keine Stütze in den sehr vielfältig abgewandelten Versuchen mit den Objekten. [Polarisationsoptisch wären dieselben Folgerungen zu ziehen, wenn Befunde an Plasmaoberflächen, Kernen und anderen Zellorganellen, dargelegt von Monné, W. J. Schmidt, dem Ref. und gewiß noch anderen leptonisch gedeutet werden sollten.] H. H. Pfeiffer (Bremen).

Literatur zur Fluoreszenz-Mikroskopie. Herausgegeben von den Optischen Werken C. Reichert AG., Wien. (Ohne Jahreszahl.)

Die wissenschaftliche Abteilung der Optischen Werke C. Reichert AG. Wien unterzog sich der dankenswerten Aufgabe, eine Bibliographie der Literatur über Fluoreszenzmikroskopie und ihrer Anwendungen zusammenzustellen (die letzterschienene Bibliographie der Zeiss-Werke liegt bereits zwölf Jahre zurück). Das Verzeichnis ist zugegebenerweise unvollständig, insbesondere fehlt die Literatur über Fl. M. in Industrie und Technik noch fast völlig, dafür wurde größtes Gewicht auf Zuverlässigkeit gelegt; jedes Zitat wurde an Hand der Originalarbeit überprüft. Die Anordnung ist sehr übersichtlich (alphabetisch nach Autoren und ein chronologischer, in Sachgebiete unterteilter Autorenindex). Die Literatur wird bis 1950 erfaßt.

O. Härtel (Graz).

Mühdorf, Anton: Die Zellteilung als Plasmateilung. 8°, VIII u. 194 Seiten, 79 Textabbildungen. Springer-Verlag, Wien 1951. S 98.—, DM 19.70, sfr. 20.20, \$ 4.70.

Die vielen Fragen, die über den in zahlreichen Varianten sich abspielenden Prozeß der Plasmateilung noch offen stehen, wurden in den letzten Jahrzehnten vollkommen überschattet durch das Interesse, das die Mitoseforschung für sich in Anspruch nahm. Und doch ist ja die Zellteilung nicht allein Kernteilung, sondern auch Plasmateilung. Es ist daher eine sehr gesunde und begrüßenswerte Reaktion gegen einseitige Betrachtungsweise, wenn Mühdorf das Licht nun von den Vorgängen am Kern einmal ab- und auf die im Cytoplasma zublendet. Diese Änderung in der Blickrichtung ist auch zeitgemäß selbst vom Standpunkt des Genetikers aus, der sich in steigendem Maße für die Plasmagene zu interessieren beginnt. Nicht nur dem Karyologen, sondern auch dem Cytoplasmatiker mag diese verdienst-

volle Monographie eine erfreuliche Überraschung bieten, denn sie zeigt ihm, wie reich — trotz aller Vernachlässigung — die Literatur über die Plasmateilung heute schon ist. Auf dieser keineswegs schmalen Basis, die Mühl-dorf liebevoll beleuchtet hat, wird nun wieder weiter aufgebaut werden.

Weber (Graz).

Pardatscher, Günter: Protoplasmatische Studien an Blütenzellen von Dahlia. Portugaliae Acta Biologica III, 171—186. 1951.

In den Epidermiszellen roter Blütenblätter von *Dahlia variabilis* treten nach Infiltration mit Wasser starke Vakuolenkontraktionen ein, und zwar besonders häufig vom 7. Blütentage an. In 8 Tage alten Blüten kann es ohne Vorbehandlung zu einer Alterskontraktion der Vakuolen kommen, die nach Infiltration mit Wasser zurückgeht. Bei starker Vakuolenkontraktion erfahren die Zellkerne eine enorme Quellung und Volumzunahme. Es wird vermutet, daß der Zellkern dabei das von der Vakuole abgegebene Wasser aufnimmt.

Weber (Graz).

Pfeiffer, Hans H.: Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin. Verfahrens- und Meßkunde der Naturwissenschaft (hgg. von H. Ebert). Heft 8. VIII u. 94 Seiten, mit 31 Abbildungen, 3 Tabellen und 12 Zahlentafeln. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig 1949.

Die optische Anisotropie biologischer Körper hat sich als eine derart wichtige Eigenschaft erwiesen, daß polarisationsoptische Methoden ein nicht mehr wegzudenkendes Requisite für jeden mit strukturellen Fragen befaßten Biologen sind. Daß diese Methoden derzeit vorwiegend qualitativ angewendet werden und ihre quantitative Auswertung auf relativ wenige Laboratorien beschränkt ist, liegt wohl am wenigsten an den hiezu nötigen Apparaturen; eher dürften präparative Schwierigkeiten (Notwendigkeit der genauen Einhaltung bestimmter Schnittdicken usw.) für viele Objekte ein Hindernis sein, ferner gewisse theoretische und physikalische Schwierigkeiten und im Zusammenhang damit auch das Fehlen einer handlichen Darstellung der hiebei in Betracht kommenden Verfahren und ihrer Grundlagen. Diesem Mangel hilft nun die Darstellung aus der Feder des Leiters des Laboratoriums für Polarisationsmikroskopie (Bremen) ab. Sie setzt, wohl durch den vorgeschriebenen Umfang bedingt, die Kenntnis der kristalloptischen Grundlagen voraus, der gewissermaßen als Repetitorium gedachte erste Abschnitt „Grundlagen und Definitionen“ kann das Studium eines einschlägigen Lehrbuches nicht ersetzen. Der zweite Abschnitt, „Verfahrenskunde“, behandelt insbesondere das Ambronn'sche Imbibitionsverfahren, Methoden zur Bestimmung von Strömungsdoppelbrechung, ortho- und konoskopischer Beobachtung und gibt Hinweise auf Kombinationsmöglichkeiten der Polarisationsmikroskopie mit anderen Verfahren, wie Vitalfärbung, Mikrochirurgie, Zentrifugenmikroskop u. a. m. (die „Disfluoreszenz“ Ziegenspecks ist noch nicht berücksichtigt). Das umfangreichste Kapitel ist der „Meßkunde“ gewidmet. Es umfaßt die Bestimmung der Schwingungsrichtungen und des optischen Charakters, die Anwendung der Kompensatoren verschiedener Systeme, Messungen im polarisierten Auflicht, Halbschattenapparate und Messung der Doppelbeugung. Zwölf Zahlentafeln bringen die beiden Messungen immer wieder benötigten zahlenmäßigen Grundlagen, die Reihen der Interferenzfarben usw.

Die Lektüre stellt namentlich durch den ausgiebigen Gebrauch mathematischer Formeln und Ableitungen (die Symboltabelle allein umfaßt zwei Seiten) einige Ansprüche besonders an den physikalisch weniger gut vorbereiteten Biologen und verlangt gründliches Studium; das Werk ist kein „Rezeptbuch“ im landläufigen Sinne. Es ist aber gerade dadurch besonders

geeignet, der bei noch wenig gebräuchlichen Verfahrensweisen bestehenden Gefahr entgegenzuwirken, daß sich zum Schaden des Ganzen einige mehr oder weniger ausschließlich angewandte bequeme Routinemethoden entwickeln. In der verlässlichen und gründlichen Darstellung der Grundlagen der Meßverfahren liegt daher der große Wert des Büchleins.

O. Härtel (Graz).

Ratzenhofer, M.: Einfaches und empfindliches Verfahren zur Erkennung bestimmter schwefelhaltiger Atomgruppen, insbesondere SH-Gruppen in Geweben und Körpersäften. Z. wiss. Mikrosk. 60, 245—250 (1951).

Die Jodacidmethode besteht im Auftragen des Reagens aus 3 g Natriumacid in 100 cm³ 0,1-n-Jodlösung. Bei Vorkommen fast nur von Mercaptanen mit CSH-Gruppen, wie im menschlichen Gewebe, ist die positive Reaktion klar. Zu Verwechslung Anlaß gebende Thiocetone mit CS-Gruppen können durch F. Feigl's Reaktion der Überführung der SH-Gruppen durch J und Natriumacetat in nichtreagierende Disulfide ausgeschlossen werden, so daß damit eine einfache, rasche und empfindliche qualitative Probe auf SH-Gruppen gegeben ist.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Inoué, Shinya: A method for measuring small retardations of structures in living cells. Expt. Cell Res. 2, 513—517 (1951).

Die mitgeteilte Halbschattenmethode mit Polarisationsmikroskop gestattet am lebenden Objekt in kurzer Zeit die Auflösung von Retardationen bis herunter auf 0,1 m μ bei einer Objektgröße von 1 μ Durchmesser.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Symposium on Biochemistry of Nucleic Acids. J. Cell. and Comp. Phys. Vol. 38. Suppl. 1. 1951.

April 1951 fand eine Arbeitstagung „Current Problems in the Biochemistry of Nucleic Acids“ statt; die auf dieser Tagung gehaltenen Vorträge liegen in einem Sonderheft zusammengefaßt vor. Über neue Ergebnisse der organischen Chemie der Nukleinsäuren berichtet Michelson, während deren Biosynthese Brown (Vorstufen), Buchanan sowie Shive (Purine und Pyrimidine) und Scott u. Cohen (Ribose) behandeln. Skeggs untersucht Nukleinsäurewirkungen auf mikrobiologische Vorgänge. Beiträge Chargaffs behandeln Struktur und Zusammensetzung, Schmidt, Cubiles, Thannhauser die Abbauprodukte nach Enzymbehandlung, während W. E. Cohn die Ionenaustausch-Chromatographie zur Trennung der Nukleinsäuren und deren Abbauprodukte anwendet. Pollister und Mitarbeiter bringen Studien zum Desoxypentosenukleinsäuregehalt tierischer Kerne. Nach Untersuchungen von Kaufmann, MacDonald u. Gay eignet sich die Kombination von enzymatischem bzw. hydrolytischem Abbau und Färbung an fixierten Schnitten zur Lokalisierung und Identifizierung von Nukleinsäuren. Mit dieser Methode wird wahrscheinlich, daß das Ribonukleoprotein der Kerne vorwiegend Histone, das des Plasmas dagegen ein tryptophanreicheres Protein enthalten, doch setzt Desoxyribonuklease-Behandlung aus Chromosomen außer Histone noch ein anderes Protein in Freiheit. Ribonuklease-Behandlung mit nachfolgender Hydrolyse mit HCl führt zum Schluß, daß die Chromosomen Nukleinsäuren enthalten, die aus Ribonukleinsäuren und Desoxyribonukleotiden aufgebaut sind.

Die zwölf Arbeiten geben einen Querschnitt durch die derzeit im Vordergrund stehenden Probleme, eine Gesamtübersicht über das Nukleinsäureproblem vermögen sie darum naturgemäß weniger zu geben.

O. Härtel (Graz).

Stanley, B. H.: The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulfhydryl reagent. *Anat. Rec.* 110: 231—248 (1951).

Die Bindung von 1- (4-chlormerkuriphenylazo)-naphthol-2 an mikroskopische Zellkomponenten hängt vom Vorkommen der Chlorquecksilbergruppe und intakter SH-Gruppen ab. Die Erprobung an diversen Präparaten beweist das SH-Vorkommen im Capillarendothel, in Insekentracheen, Retina-Stäbchen und Axoplasma und Plasmaleibern gewisser peripherer Nerven und Ganglienzellen von Vertebraten und Invertebraten.

Hans H. Pfeiffer (Bremen).

Tischler, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie, 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung. (Handb. d. Pflanzenanatomie, Allgem. Teil, Bd. 2/2.) VIII + 1040 S., ill. Berlin-Nikolassee (Naturw. Verlag vorm. Gebr. Borntraeger) 1951.

Mit der jüngst erschienenen Schlußlieferung ist nunmehr der Rest des zweiten Teilbandes vorgelegt und das Standardwerk für jeden Karyologen, Zellmorphologen, -physiologen, Systematiker und nicht zuletzt auch für den Protoplasmatiker zum vorläufigen Abschluß gekommen, nachdem die jetzt vor 30 Jahren erschienene 1. Aufl. des Gesamtwerkes in ihrem ersten Teilbande bereits 1934 zum zweiten Male den Weg zum Benutzer angetreten hatte. Auch wenn die Schlußlieferung fast nur die mehr als 6700 im zweiten Teilbande angeführten und behandelten Arbeiten zusammen mit den Verzeichnissen der Autoren, der Objekte, der Sachgegenstände und der wesentlichen Bezugsstellen auf den 1. Teilband sowie während der Drucklegung (seit 1942 bzw. 1943) dringlich gewordene Nachträge und Zusätze bringt, werden die Benutzer doch über den Abschluß froh sein, da erst jetzt die bequeme Benutzung des stofflich schier unerschöpflichen Werkes möglich wird. Wie der erste Teil weicht auch der 2. Teilband in der neuen Auflage hinsichtlich Verteilung und Gliederung des Stoffes nur wenig von der Bearbeitung vor 30 Jahren ab. So folgen den allgemeinen Betrachtungen über die Auslösung von Kernteilungen je ein Kapitel über ihre Beeinflussung durch innere und durch Außenfaktoren und eines über Kernteilungen in mehrkernigen und benachbart gelegenen Zellen als Überleitung zu dem über die Furchungsteilungen und dem über das Erlöschen der Teilungstätigkeit. Sodann werden gesondert für Mitosen und Meiosen jeweils die Ergebnisse bei Kormo- und bei Thallophyten und gewisse Unregelmäßigkeiten im Ablauf der beiderlei Teilungsgeschehen behandelt und in je einem weiteren Kapitel die Mechanik der Kernteilungen und die sexuellen und somatischen Kernverschmelzungen behandelt. Trotz der Ähnlichkeit im Gang der Themen zeigt die Bearbeitung aber an allen Stellen die Meisterhand des Verfassers in der kritischen Sichtung und umfassenden Zusammenschau auch des neuen Stoffmaterials und bei sehr vielen der behandelten Fragen und Erscheinungen auch in der vollkommenen Neubearbeitung vieler oft umfangreicher Abschnitte. Eine solche Neugestaltung wurde vielfach schon durch das gewaltige Anwachsen der zu verarbeitenden Ergebnisse der neueren Forschung notwendig, umfaßt doch die 2. Auflage des Gesamtwerkes statt 900 jetzt fast 1700 Seiten. Die gewaltige Arbeitsleistung ist um so bewundernswerter, als dieser 2. Teilband in schwerer Zeit (1939) begonnen und in einer Zeit, da die ausländische Literatur noch längst nicht wieder bequem zugänglich ist, fortgeführt und beendet werden mußte. Trotzdem ist es gelungen, eine Fülle der Allgemeinheit meist schwer oder gar nicht zugänglicher Arbeiten des Auslandes noch zu erfassen und auszuwerten, so daß das Werk wie früher bei der Suche nach der Literatur zu einer bestimmten Fragestellung eine sicher nie versagende Informations-

quelle bildet. Noch mehr wird das aber nach Erscheinen des bereits angekündigten Ergänzungsbandes zutreffen, welcher insbesondere auch die angewandte Karyologie erfassen soll, und der Wunsch des Lesers, diese das Grundwerk komplettierende Ergänzung in nicht zu ferner Zeit in Händen zu haben, wird Verfasser und Verleger verständlich sein. Zu Tischlers zweibändigem Werke wird gerade auch der Protoplasmatiker immer wieder gerne und mit sicherem Nutzen greifen, weil sich der Verf. für Fragestellungen und Untersuchungen der Protoplasmatik in seltener Weise aufgeschlossen zeigt, ohne daß sich das Buch darauf beschränkt; vielmehr wird der Leser ebenso über der Protoplasmatik ferner liegende karyologische Ergebnisse und Begriffe, soweit sie der reinen Morphologie und deskriptiven Cytologie angehören oder dahin übergreifen, zuverlässig informiert. Da die trotz reicher Forschungsergebnisse der letzten Zeit noch verbliebenen Lücken unserer Kenntnis mit kundiger Hand hier aufgezeigt werden, finden wir wie in dem ersten Bande auch in dem jetzt abgeschlossenen wieder eine Fülle von Anregungen zu neuen Forschungsaufgaben. So steht jetzt in dem zweibändigen Handbuche Tischlers wieder die umfassende Darstellung der botanischen Karyologie zur Verfügung, wie sie im deutschen Sprachraum sonst nicht mehr gefunden wird, ein Werk, das an jeder Stelle, an welcher es aufgeschlagen wird, und zu jeder Frage, über welche es konsultiert wird, ein stets zuverlässiges Bild vom Stande der gegenwärtigen Forschung zeichnet. So bedarf das Handbuch, das auch durch sauberen Druck trotz einfacher Ausstattung angenehm auffällt, keiner Empfehlung mehr und sind Verleger und Verfasser zu dem Erfolge nur warm zu beglückwünschen.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Vries, H. de: Rotatory power and other optical properties of certain liquid crystals. Acta crystallographica 4, 219—226 (1951).

Die auf einen engen Wellenlängenbereich begrenzte optische Aktivität und selektive Reflexion zirkular polarisierten Lichtes bei Derivaten des Cholesterin und anderen mesomorphen Phasen werden mit spiraliger Anordnung der Molekeln erklärt. Bei Drehung der Achse über die Dicke p resultiert, wenn n den Brechungskoeffizienten bedeutet, Reflexion

für den Wellenlängenbereich $p \cdot n$ und die Drehung $a = \frac{n_2 - n_1}{n}$. Aus den

Größen p und a sind alle optischen Eigenschaften zu berechnen.

H. H. Pfeiffer (Bremen).

Berichtigungen

Pischinger, Alfred: Über die Struktur des Zellkernes. (Ein experimenteller Beitrag zur Klärung zytologischer Strukturfragen.) Protoplasma 39, 567 (1950).

S. 569, Abb. 1: unter die linke Hälfte ist a , unter die rechte b zu setzen.

S. 572, Unterschrift zu Abb. 2, lies: Ap. 1,4 statt: App. 1,4.

S. 573, Abb. 3: links neben die obere Reihe ist p_H 7,1, neben die untere p_H 3,8 zu setzen; unter die Abbildung ist zur ersten Kolonne 0^h , zur zweiten $\frac{1}{2}^h$, zur dritten 1^h und zur vierten 2^h zu setzen.

S. 574, Abb. 4: neben die obere Reihe ist p_H 7,1, neben die untere p_H 3,8 zu setzen; unter die Abbildung ist zur ersten Kolonne 0^h , zur zweiten 5^h zu setzen.

S. 574, Unterschrift zu Abb. 5, lies: Ap. 1,4 statt: App. 1,4; linke Hälfte „a“, rechte Hälfte „b“.

S. 575, Abb. 6 ist umzukehren; die rechte Hälfte ist mit a zu bezeichnen und soll links stehen, die linke Hälfte heißt b und soll rechts stehen.

S. 580, Zeile 8 von unten, lies: Feststellungen, übrigens statt: Feststellungen übrigens.

S. 580, Zeile 7 von unten, lies: scheint noch statt: scheint es mir noch.

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastel 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, und Prof. Dr. Josef Spek, Rostock, Zoologisches Institut. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

L

S

A

2

11

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt

| | |
|--|--------------|
| Metzner, Helmut: Die Reduktion wäßriger Silbernitratlösungen durch Chloroplasten und andere Zellbestandteile | 8. 10. 1951 |
| Boerner, Dora: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden.... | 25. 10. 1951 |
| Bauer, Leopold: Über den Wasserhaushalt der Submersen. 1. Zur Frage der Saugkräfte der Submersen | 19. 12. 1951 |
| Arnold, A.: Über den Funktionsmechanismus der Endodermiszellen der Wurzeln | 27. 12. 1951 |
| Grünwald, Walter: Osmotische Zustandsgrößen isoliert gezogener Tabakswurzeln (Kurze Mitteilung) | 16. 1. 1952 |
| Walzel, Gertraud: Vitamin C in <i>Cuscuta</i> (Kurze Mitteilung)..... | 28. 1. 1952 |
| Munding, Herta: Untersuchungen zur Frage der Strahlenresistenz des Chlorophylls in den Chloroplasten..... | 2. 2. 1952 |
| Joyet-Lavergne, Ph.: L'aspect cytophysiologique du problème du cancer... | 5. 2. 1952 |
| Ziegenspeck, Hermann: Die Wegsamkeit der Pigmentschicht der Getreidekörner (Endodermis-schicht) für Fluorochrome..... | 8. 2. 1952 |
| Rezende-Pinto, de M. C.: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. Ergebnisse und Probleme (Sammelreferat) | 12. 2. 1952 |
| Small, James: The new outlook on p_H | 19. 2. 1952 |

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Biologia generalis

Archiv für die allgemeinen Fragen der Lebensforschung

Herausgegeben von

Ludwig von Bertalanffy

Wien, u. Zl. Ottawa (Canada)

Zuletzt erschienen:

Band XIX, Heft 4 (Schlußheft)

(Abgeschlossen im Juli 1951)

Mit 7 Textabbildungen. 88 Seiten. 1951. S 69.—, DM 15.10, \$ 3.60, sfr. 15.50

Inhalt: Meunier, K. Korrelation und Umkonstruktion in den Größenbeziehungen zwischen Vogelflügel und Vogelkörper. — Aigner, A. Kann es mehr als zwei Geschlechter geben? — Fischer, R. Menotoxine. — Herre, W. Tierwelt und Eiszeit.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von

Lothar Geitler

Wien

Zuletzt erschienen:

Band IC, Erstes Heft

(Abgeschlossen im Januar 1952)

Mit 53 Textabbildungen. 172 Seiten. 1952. S 129.—, DM 27.90, \$ 6.50, sfr. 29.20

Inhalt: Gschöpf, O. Das Problem der Doppelplättchen und ihrer homologer Gebilde bei den Diatomeen. — Rechinger, K. H. *Labiatae novae orientales*. — Baum, Hermine. Die doppelspreitigen Petalen von *Ranunculus auricomus* und *neapolitanus*. — Geitler, L. Die Auxosporenbildung von *Rhoicosphenia curvata*. — Buxbaum, F. Morphologie des „Spaltcephaliums“ von *Esposita sericata*. — Schiller, J. Neue Mikrophyten aus dem Neusiedler See und benachbarter Gebiete. — Holzer, K. Untersuchungen zur karyologischen Anatomie der Wurzel. — Mack, B. Über ein eigentümliches Verhalten isolierter Plastiden in der Magenwand des Rotators *Ascomorpha caudis* Party.

Österreichische Zoologische Zeitschrift

Herausgegeben von

Otto Storch

Wien

Zuletzt erschienen:

Band III, Drittes und viertes Heft

(Abgeschlossen im Juni 1951)

Mit 67 Textabbildungen. 240 Seiten. 1951. S 164.—, DM 34.—, \$ 8.10, sfr. 35.—

Inhalt: Koenig, O. Das Aktionssystem der Bartmeise (*Parus biarmicus* L.). Zweiter Teil. — Schremmer, F. Die Mundteile der Brachycerenlarven und der Kopfbau der Larve von *Stratiomys chamaeleon* L. — Eibl-Eibesfeldt, I. Stammesgeschichtliche Reminiszenzen in der abdominalen Zeichnung einiger Spinnen. — Schaefferberg, B. und E. Kupka. Untersuchungen über die geruchliche Orientierung blutsaugender Insekten. I. Über die Wirkung eines Blutduftstoffes auf *Stomoxys* und *Culex*. — Wieser, W. Untersuchungen über die eigenbewohnende Mikrofauna mariner Hartböden.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

